

Departement für Nutztiere, Klinik für Fortpflanzungsmedizin
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. Wolfgang Kähn

Arbeit unter Leitung von Dr. Peter Klocke

Gruppe Tiergesundheit,
Forschungsinstitut für biologischen Landbau (FIBL)

**WIRKSAMKEITSPRÜFUNG DES MISTELPRÄPARATES
ISCADOR® M IN DER MASTITISTHERAPIE BEIM RIND**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

IRENA MARC

Tierärztin
aus Slowenien

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. W. Kähn, Referent

Prof. Dr. W. Langhans, Korreferent

Zürich 2006

1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 SUMMARY	3
3 ABKÜRZUNGEN.....	5
4 EINLEITUNG	8
5 LITERATUR	10
5.1 DIE MISTEL	10
5.1.1 Botanischer Überblick.....	10
5.1.2 Historisch medizinischer Überblick	11
5.1.3 Die Inhaltsstoffe der Mistel.....	12
5.1.4 Interaktion von Antigenen aus Mistelextrakten mit dem Immunsystem.....	14
5.1.5 Onkologische Grundlagenforschung zur Misteltherapie	17
5.1.5.1 Pharmazeutik der verschiedenen Mistelpräparate	18
5.1.5.2 Methodik des Einsatzes.....	21
5.1.5.3 Klinische Anwendung von Mistelpräparaten in der Praxis	22
5.1.5.4 Resultate des Einsatzes	23
5.2 MASTITIS.....	25
5.2.1 Bedeutung der Mastitis des Rindes	25
5.2.2 Formen der Mastitis	26
5.2.3 Mastitisserreger	27
5.2.3.1 Staphylokokken als Mastitisserreger.....	28
5.2.3.2 Streptokokken als Mastitisserreger	30
5.2.4 Faktoren der unspezifischen und spezifischen Abwehr.....	32
5.2.4.1 Faktoren der unspezifischen Abwehr	32
5.2.4.2 Faktoren der spezifischen Abwehr	36
5.2.5 Verlauf von Staphylokokken- und Streptokokken-Mastitiden	38
5.2.6 Therapie und Prophylaxe.....	40
5.2.7 Probleme der Mastitistherapie	47
6 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	49
7 VERTRÄGLICHKEITS- UND WIRKUNGSSTUDIE AN GESUNDEN KÜHEN	50
7.1 ZIELSETZUNG	50
7.2 TIERE, MATERIAL UND METHODEN	50
7.2.1 Versuchstiere	50
7.2.2 Versuchspräparat Iscador® M.....	50
7.2.3 Verbrauchsmaterial und Laborgeräte	51
7.2.4 Behandlungsprotokoll	51
7.2.5 Blutentnahme und Blutanalysen	53
7.2.6 Messung der Körpertemperatur und Hautdicke	53
7.2.7 Statistische Berechnungen	54
7.3 ERGEBNISSE	55
7.4 DISKUSSION	59
8 WIRKUNGS- UND DOSISFINDUNGSSTUDIE AN GESUNDEN KÜHEN	61
8.1 ZIELSETZUNG	61
8.2 TIERE, MATERIAL UND METHODEN	61

8.2.1 Versuchstiere	61
8.2.2 Versuchspräparat Iscador® M	61
8.2.3 Verbrauchsmaterial und Laborgeräte	61
8.2.4 Behandlungsprotokoll	62
8.2.5 Blutentnahme und Blutanalysen	65
8.2.5.1 ELISA-Verfahren zur Bestimmung von anti-ML-1 Antikörpern	65
8.2.5.2 Ammoniumchloridlysemethode zur Gewinnung von Blutleukozyten	66
8.2.5.3 Histopaque Methode zur Gewinnung von mononukleären Zellen	66
8.2.5.4 Durchflusszytometrie	68
8.2.6 Statistische Berechnungen	70
8.3 ERGEBNISSE	71
8.4 DISKUSSION	80
9 WIRKUNGS- UND DOSISFINDUNGSSTUDIE BEI KÜHEN MIT CHRONISCHER MASTITIS	85
9.1 ZIELSETZUNG	85
9.2 TIERE, MATERIAL UND METHODEN	85
9.2.1 Versuchstiere	85
9.2.2 Iscador® M	86
9.2.3 Behandlungsprotokoll	86
9.2.4 Verbrauchsmaterial	88
9.2.5 Blutentnahme und Blutanalysen	89
9.2.5.1 ELISA-Verfahren zur Bestimmung von Antikörpern	89
9.2.5.2 Durchflusszytometrische Untersuchungen des peripheren Blutes	89
9.2.6 Milchentnahme und -analysen	89
9.2.6.1 Gewinnung von Leukozyten aus der Milch	90
9.2.6.2 Durchflusszytometrie	90
9.2.7 Statistische Berechnungen	90
9.3 ERGEBNISSE	91
9.4 DISKUSSION	107
10 AUSBLICK	111
11 LITERATUR	113
12 DANK	132

1 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob das kommerzielle Mistel-Präparat (*Viscum album*) Iscador® M (Weleda, Arlesheim) bei gesunden und chronisch an Mastitis erkrankten Kühen einen immunmodulatorischen und –stimulatorischen Einfluss besitzt.

Im ersten Studienabschnitt wurde Iscador® M zehn Wochen lang, 3-mal wöchentlich in ansteigender Dosierung (0.01 mg – 20 mg/Tier) an gesunden Kühen subkutan injiziert. Während der Behandlung wurde die Lokalreaktion und Gewebeverträglichkeit bei subkutaner Verabreichung von Iscador® M evaluiert und eine klinische sowie immunstimulierende Wirkung überprüft. Dabei zeigte sich, dass Iscador® M gut vertragen wird und ausser einer lokalen entzündlichen Reaktion im Bereich der Injektionsstelle keine anderen, klinisch erfassbaren Nebenwirkungen verursachte.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden die gesunden Kühe zehn Wochen lang, 3-mal wöchentlich mit Dosen zwischen 1 mg und 100 mg behandelt. Die Bestimmung des Profils der verschiedenen Blutzellfraktionen (Lymphozyten, Monozyten, eosinophilen Granulozyten, basophilen Granulozyten und neutrophilen Granulozyten) zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollen und mit Iscador® M behandelten Kühen. Iscador® M stimulierte auch in vitro die Proliferation der PBMC (peripheral blood mononuclear cells) nicht. Bei den Analysen der Anti-ML-1 (ML-1) Antikörper wurde das Plasma auf Antikörper vom IgG-Typ untersucht. Hierbei war auffallend, dass bei allen Kühen im Gegensatz zum Menschen schon vor der Iscador-Behandlung ein niedriger Antikörpertiter im Blut zu beobachten war. Die Verabreichung von Iscador® M führte bei allen Kühen zu einem Anstieg des Antikörpertiters. Die Intensität der humoralen Immunantwort war individuell unterschiedlich.

Im dritten Studienabschnitt wurde in der 8-wöchigen Behandlung mit Iscador® M, im Dosisbereich zwischen 1 mg und 150 mg die zelluläre und humorale Immunreaktion von chronisch mastitis-kranken Kühen untersucht. Die Quantifizierung der verschiedenen Blutzellen (Lymphozyten, Monozyten, eosinophile Granulozyten, basophile Granulozyten und neutrophilen Granulozyten) ergab dabei keine Unterschiede zwischen den Kontrollen und den mit Iscador behandelten Kühen.

Um genauere Aussagen über den Anteil der unterschiedlichen

Lymphozytensubpopulationen machen zu können, wurden in weiteren FACS-Analysen einige Zellpopulationen in der Milch sowie im Blut bestimmt. Dabei stellte sich heraus, dass Iscador® M auch keine Veränderungen im Anteil der CD4 (T-Helfer-), CD8 (Suppressor-

/Zytotoxischen T-) und CD21 (B-Zellen) Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe verursachte.

Die Analyse der Phagozytoseaktivität der Monozyten zeigte ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

Unter der Iscador-Behandlung kam es im höheren Dosisbereich bei den Kühen zur starken Produktion von Anti-ML-1 Antikörpern des IgG-Typs. Niedrige Antikörpertiter konnten schon vor der Iscador-Exposition bei allen Kühen nachgewiesen werden. Der Verlauf und die Stärke des Antikörperaufbaus waren in jeder Gruppe individuell unterschiedlich.

Die systemische Behandlung der Kühe mit Iscador hatte auch keinen Einfluss auf die Milchbakteriologie und die Zellzahl. Bei den Analysen dieser Daten fiel auf, dass die Zellzahl trotz unverändertem bakteriologischen Bild abnahm. Dabei konnte ein Zusammenhang zwischen der Zellzahl und Haltung sowie Melktechnik vermutet werden.

Die Annahme einer Übertragbarkeit der Resultate zur systemischen Mistelbehandlung mit Iscador in der humanmedizinischen Krebstherapie auf eine Therapie subklinischer Mastitiden bei Kühen konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

2 Summary

In this work the immunomodulatory and immunostimulatory effects of the commercially available mistletoe (*Viscum album*) preparation Iscador® M (Weleda, Arlesheim) was first examined in healthy cows and then in cows with chronic mastitis.

In treatment of healthy cows Iscador® M, with escalating doses from 0,01 mg to 20 mg, was used 3-times per week for ten weeks. The local reaction, tissue compatibility and clinical as well as immunostimulatory effects of subcutaneously administered Iscador® M were evaluated during the treatment. It was shown that Iscador® M was well tolerated and, except for a local inflammatory reaction at the injection site, no other negative side effects were noted.

In further study healthy cows were treated with Iscador® M, in doses between 1 mg - 100 mg, for ten weeks. The antibodies against Mistletoe-lectin1 (ML-1) of the IgG- type were examined in plasma. It was remarkable that in all cows, in contrast to humans, a low value of anti-ML-1 antibodies in the blood was already observed prior to Iscador treatment. Administration of Iscador® M caused a rise of the antibody titre against ML-1 in all cows. The strength of the humoral immune response showed individual variations. The analyses of different blood cells (lymphocytes, monocytes, eosinophiles basophiles and neutrophiles) revealed no significant differences between treated and untreated cows. Also, no stimulation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of treated cows in response to Iscador® M could be observed in vitro.

In the third stage of the study cows with chronic mastitis were treated for eight weeks and their cellular and humoral immune response against Iscador® M, in doses between 1 mg and 150 mg, was evaluated. Analyses of different blood cells (lymphocytes, monocytes, eosinophiles, basophiles and neutrophiles) revealed no differences between the treatment and the control group. To obtain further information on the proportion of different lymphocyte subtypes involved in this in vivo reactivity, additional flow cytometric analyses in the milk as well as in the blood were performed. This revealed that Iscador® M caused no changes in the proportion of CD4 (helper T cells), CD8 (suppressor/cytotoxic T cells) and CD21 (B cells) in comparison to the control group. Analyses of the phagocytic activity of monocytes also did not reveal any differences between the groups. The administration of higher doses of Iscador® M resulted in a more pronounced production of anti-ML-1 antibodies of the IgG- type. Again, low antibody titres were observed prior to Iscador® M exposure in all cows, and the course and the strength of the antibody production was

individually variable. Iscador treatment also had no influence on the milk bacteriology and the somatic cell count (SCC). In the analyses of these data it was noticeable that the SCC decreased despite an unchanged bacteriological picture. The decrease of SCC was probably a consequence of good herd management and milking technique.

The results of the systemic treatment with mistletoe drug of cancer in human medicine could not be confirmed as transferable to the therapy of subclinical mastitis in cows in this study.

3 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADCC	antibody dependent cellular cytotoxicity
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
AK	Antikörper
Altersgr.	Altersgruppe
ATP	Adenosin-Triphosphat
BG	Behandlungsgruppe
Beh	Behandlung
BL	Baselinewert
BSA	Bovines Serumalbumin
BW	Behandlungswoche
ca.	circa
CD	cluster of differentiation
CNS	koagulasenegative Staphylokokken
Con A	Concanavalin A
cpm	counts per minute
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DIFF	Blutzelldifferenzierung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft
E. coli	Escherichia coli
ELISA	Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay
ELLA	Enzyme-linked-lectin assay
FACS	Fluorescence-activated-cell-sorter
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
g	Gramm
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor
GM-CSF	granulocyte-monocyte colony-stimulating factor
h	Stunde
HIV	human immunodeficiency virus
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin

IL	Interleukin
K ₂ EDTA	Kalium-Ethylendiamin-tetraessigsäure
KBE	Kolonie bildende Einheiten
kD	kilo Dalton
KG	Körpergewicht
KO	Kontrollgruppe
l	Liter
Iscador P	Iscador Pini
LBE	Lektin-bindende Einheiten
LD	lethale Dosis
LGL	large granular lymphocyte
Li	Lithium
m	Milli
M	Molar
mAk	monoklonale Antikörper
MFI	mean fluorescence intensity, Durchschnittliche Fluoreszenzintensität
MG	Molekulargewicht
MHC	major histocompatibility complex
MIF	Migration inhibition factor
ML	Mistellektin
Mo/Ma	Monozyten/Makrophagen
MRSA	Methicillin-resistente Stämme
n. Chr.	nach Christi
NaN ₃	Natriumazid
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
NWF	Nullwertfaktor
OD	optical density
PBMC	periphera blood mononuclear cells
PBS-Tw	phosphate buffered saline-tween
PMN	polymorphkernige Granulozyten
POD	Meerrettichperoxidase
postp.	postpartum

prep.	prepartum
rbIL	recombinant bovine Interleukin
RG	Reaktionsgruppe
ROS	reactive oxygen species
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SA	Standard Abweichung
Sc.	Streptococcus
s.c.	subcutan
SCC	somatic cell count
sp.	Spezies
ssp.	Subspezies
St.	Staphylococcus
St. a.	Staphylococcus aureus
Th	T-Helferzellen
TNF	Tumor-Nekrosis-Faktor
Ts	T-Supressor-Zellen
Tw	Tween
UV	Ultraviolett
Viscum album L.	Viscum album Linné
v. Chr.	vor Christi
w/v	weight/volume, Gewicht/Volumen
WHO	World health organisation
ZZ	Zellzahl

4 Einleitung

Beim Milchvieh stellen Mastitiden weltweit das relativ und absolut bedeutsamste Gesundheitsproblem dar (De Oliveira et al., 2000). Hierbei spielen ausser den klinischen Fällen vor allem die schwer therapierbaren chronischen Formen eine zunehmend wichtige Rolle und leisten ausserdem einen erheblichen Beitrag zu einer Erhöhung des somatischen Zellgehalts der Anlieferungsmilch (Kasche, 1995).

Der uneingeschränkte Gebrauch von Antibiotika kann einerseits zur Kontamination der Nahrungsmittel und andererseits zur Entwicklung antibiotikaresistenter Keime führen (Politis et al., 1991), die eine potentielle Quelle für die Übertragung von bakterieller Resistenz zwischen den Tieren sowie in der Bevölkerung darstellen (Levy et al., 1976). Auch der biologische Landbau fordert aufgrund möglicher bakterieller Resistenz und Rückstände in den Lebensmitteln eine Reduktion des Einsatzes von Antibiotika. Die therapeutische Behandlung von Tieren sollte durch vorbeugende Massnahmen im Bereich Tierhaltung, Fütterung, Zucht und Management deutlich reduziert und durch phytotherapeutische und homöopathische Erzeugnisse ersetzt werden, sofern diese tatsächlich eine therapeutische Wirkung auf die betreffende Tierart und die zu behandelnde Krankheit haben (Graf et al., 1999).

Die Behandlung der Mastitiden verbesserte sich in den letzten Jahren zwar durch Diagnostik und Therapie, aber die an die schulmedizinischen Therapieformen gestellten hohen Erwartungen wurden nicht erfüllt (Kasche, 1995). Aufgrund neuer Erkenntnisse über Immunmechanismen werden zunehmend auch neue Therapiemöglichkeiten untersucht. Während der letzten Dekade wurde beispielsweise die Frage der Immunisierung von Kühen zur Mastitisbekämpfung wiederholt diskutiert und es wurden verschiedene Untersuchungen hierzu angestellt (Giraud et al., 1997, Calzolari et al., 1997, Nordhaug et al., 1994a, 1994b). Ein weiterer Therapieansatz besteht in der Verabreichung von Zytokinen, wie rekombinantem bovinen Interleukin (rIL)-2 und rIL-1 β , die zu einer verstärkten Immunantwort auf humoraler und zellulärer Ebene führen können (Daley et al., 1991, 1992).

Seit der Einführung von Mistelpräparaten zur Behandlung von Krebserkrankungen durch Rudolf Steiner gibt es in der Literatur viele Angaben zu deren immunstimulierenden sowie -modulierenden Wirkungen auf die verschiedenen Zellen des Immunsystems, die in vivo und in vitro bei Mensch und Tier überprüft wurden (Beuth et al., 1992, 1993, 1994, 1995, Metzner et al., 1985, Stein, 1995, Klett und Anderer., 1989). Aufgrund vieler positiver

klinischer Erfahrungsberichte über die Wirkung von Mistelpräparaten bei Patienten aus der Humanmedizin, stellte sich die Frage, ob es möglich wäre, durch Applikation des Mistelpräparates-Iscador® M beim Rind eine Stimulation des Immunsystems erreichen und für eine Therapie von Mastitiden anwenden zu können.

5 Literatur

5.1 Die Mistel

5.1.1 Botanischer Überblick

Die weissbeerige Mistel, *Viscum album* L. ist ein epiphytischer Sprossparasit, der zur Familie der Viscaceae gehört (Luther und Becker, 1986). Es gibt etwa 1200 verschiedene Mistelarten, die vor allem in Europa, Nordwestafrika, Südwest- und Zentralasien bis nach Japan Verbreitung finden (Hegi, 1980). Die in Japan verbreitete Pflanze wird als eigene Varietät angesehen, *Viscum album* L. Spp. *Coloratum* Ohwi (Becker, 1986). Innerhalb der Art *Viscum album* unterscheidet man ferner drei verschiedene Unterarten (Hegi, 1980).

Tabelle 1: Aufteilung der *Viscum album* Unterarten hinsichtlich ihrer Wirtsspezifität.

Laubholzmistel	<i>Viscum album</i> L. spp. <i>Platyspermum</i> Kell. <i>Viscum album</i> L. spp. <i>Album</i>
Tannenmistel	<i>Viscum album</i> L. spp. <i>Abietis</i> Beck
Kiefernmistel	<i>Viscum album</i> L. spp. <i>laxum</i> Fiek <i>Viscum album</i> L. spp. <i>austriacum</i> (Wiesb.) Vollmann

Die drei Unterarten zeigen eine strenge Wirtsspezifität, die nur in Ausnahmefällen, wie z.B. nach künstlicher Infektion, durchbrochen wird. In der Natur erfolgt die Verbreitung der Mistelsamen durch verschiedene Vogelarten. Eine Gruppe von Vögeln (Misteldrossel, Wacholderdrossel, Seidenschwanz) frisst die Mistelbeeren und setzt die Samen mit einer Restschleimschicht, aber ohne Beerenhaut auf den zukünftigen Wirtsbäumen ab. Die andere Gruppe wie z.B. die Mönchgrasmücke frisst nur die Beerenhaut, und lässt die Samen mit der Schleimschicht auf einem dem Mistelbusch benachbarten Ast zurück. Der Samen beginnt im Frühjahr zu keimen. Der Keimling entwickelt eine Haftscheibe, die dem Periderm des Wirts aufliegt, und dringt mit einem so genannten Senker bis zum Xylem des Wirtes vor, aus dem er eine an Substanzen reiche, wässrige Lösung in sich aufsaugt. Die Entwicklung der beiden ersten Blätter erfolgt erst nach 10-12 Monaten. Die Mistel-Pflanze bildet häufig eine Kugelform mit bis zu 1.5 m Durchmesser und lanzettförmigen, äquifazial

aufgebauten Blättern aus, durch welche die Mistel selber zur Photosynthese befähigt wird. Misteln sind diözisch. Ein immergrüner Mistelbusch trägt entweder nur männliche oder nur weibliche Blüten, die sich zwischen Ende Februar und Anfang April öffnen. Die Beeren, die im botanischen Sinn Scheinbeeren sind, werden erst gegen Ende des Jahres reif (Luther und Becker, 1986).

5.1.2 Historisch medizinischer Überblick

In den letzten beiden Jahrtausenden wurde über die Europäische Mistel sehr viel Widersprüchliches geschrieben. Mythen verschiedener Völker, Volksbräuche von Westeuropa bis Japan und abergläubische Vorstellungen ranken sich um diese Pflanze.

Die Mistel wurde von vielen Medizinern des Altertums und des Mittelalters als Heilpflanze aufgeführt (Franz, 1985). Hippokrates (460-377 v. Chr.) erwähnte bereits die Anwendung von Mistelextrakten bei der „Milzsucht“. Celsus (um Christi Geburt) sah in der Epilepsie und auch bei Krebs eine Indikation für die Misteltherapie. Plinius G.P. Secundus (23-79 n. Chr.) gebrauchte Misteln bei Epilepsie und Schwindel. Diese Indikationen finden sich bis hin zu den Ärzten des 18. und 19. Jahrhunderts (Luther und Becker, 1986). In zahlreichen mittelalterlichen Kräuterbüchern wurden Mistelextrakte zur Behandlung von Epilepsie, „Milzsucht“, „Brustenge“, Fertilitäts- und Geburtsstörungen unterschiedlicher Genese beschrieben. In der Volksmedizin, z.B. bei den Kelten, wurde die Mistel vielfach gar als Allheilmittel betrachtet (Luther und Becker, 1986, Franz, 1985). Um 1890 begannen erste chemische Untersuchungen charakteristischer Mistelinhaltsstoffe. Eine Periode mit wieder zunehmendem klinisch-pharmakologischen Interesse an Mistelpräparaten wurde durch Experimente Gaultiers 1907 eingeleitet. Dieser fand nach intravenöser Gabe von Mistelextrakten eine deutliche Blutdrucksenkung beim Menschen und, zusammen mit Chevalier, auch am Versuchstier. Der Begründer der Anthroposophie bzw. der Anthroposophischen Medizin, Rudolf Steiner, empfahl 1920 die Mistelextrakte gegen Krebs, als noch keine Untersuchungsergebnisse über zyto- oder tumortoxisch wirkende Inhaltsstoffe der Mistel vorlagen (Luther und Becker, 1986). Koch (1938) versuchte unabhängig davon, die zytostatische Wirkung mit Hilfe von einigen in vivo- und in vitro-Krebsmodellen nachzuweisen.

In den vergangenen Jahrzehnten wurden die Empfehlungen Steiners von Wissenschaftlern aufgegriffen, wobei sich die Forschung auf die Analyse der Inhaltsstoffe der Mistel und deren Einflüsse auf das Immunsystem konzentrierte (Stein, 1995).

5.1.3 Die Inhaltsstoffe der Mistel

Zu den wichtigsten Inhaltsstoffen der Mistel gehören vor allem Proteine und Glykoproteine, wie z.B. Viscotoxine, Lektine sowie Oligo- und Polysaccharide.

Viscotoxine sind basische Polypeptide mit einem Molekulargewicht von ca. 5 kD, die sich aus 46 Aminosäuren aufbauen (Wagner et al., 1984). Bisher konnten die Viscotoxine A2, A3 und B in Reinform isoliert werden (Konopa et al., 1980). Bezeichnend für Viscotoxine ist ihre hohe Toxizität bei parenteraler Applikation (LD_{50} bei Mäusen intraperitoneal 0.5 mg/kg KG, intravenös 0.1 mg/kg KG). Die gleichen Proteine verursachen bei Kaninchen nach intradermaler Injektion Hautnekrosen, haben aber keine kanzerostatische Aktivität (Luther und Becker, 1986). Auf bestimmte Tumorzellarten wurde ein toxischer Effekt von Viscotoxinen gefunden, der auf die Zerstörung der Zellmembran zurückzuführen ist (Franz, 1986). Stein et al. (1999) fanden, dass Viscotoxine starke immunmodulierende Effekte auf menschliche Granulozyten zeigen.

Die zweite wichtige Gruppe der Mistel-Inhaltsstoffe stellen die Lektine dar, die zu den Glykoproteinen gehören. Nach ihrer Zuckerspezifität unterscheidet man: Mistellektin 1 (ML-1) oder auch Viscumin, ML-2 und ML-3, mit Molekulargewichten zwischen 50 und 65 kD (Schink, 1990, Franz et al., 1981, siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Darstellung der Mistellektine aus *Viscum album* bezüglich ihrer Zuckerspezifität.

Mistellektin	Abk.	Zucker
Mistellektin I	ML-1	D-Galaktose
Mistellektin II	ML-2	D-Galaktose, N-Acetyl-D-Galaktosamin
Mistellektin III	ML-3	N-Acetyl-D-Galaktosamin

Lektine bestehen aus einer A- und B-Kette, welche durch Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Die A-Kette ist für die toxischen Eigenschaften des Lektins verantwortlich, die schwerere B-Kette für die Bindungsspezifität zu den Zielzellen. Mistellektine zeigen strukturelle und funktionelle Verwandtschaft zu den Ricinuslektinen (*Ricinus communis*) und Lektinen aus Abrin (*Abrus praecatorius*, Franz et al., 1982). Die A-Kette der drei Lektine hemmt die Proteinsynthese in zellfreien und zellulären Systemen, speziell in Makrophagen und Lymphozyten. Bei Granulozyten zeigen sich keine zytotoxischen Effekte, nur die allergenspezifische Histaminfreisetzung wird verhindert (Luther et al., 1978). Neben der Agglutination von Erythrozyten und Tumorzellen ist die Bindung des

Lektins an verschiedene Glykoproteine aus Humanserum und an Galaktane pflanzlichen und tierischen Ursprungs bekannt (Luther, 1976).

Tabelle 3: Die wichtigsten Inhaltsstoffe der Mistel, (Wagner et al., 1984).

Chemische Klasse	Inhaltsstoffe
Proteine und Glykoproteine	Lektine Viscotoxine
Oligo- und Polysaccharide	Galakturonane Arabinogalaktane Rhamnogalakturonane
Flavonoide	Quercetinderivate
Phenylpropane und lignane	Syringin Eleutherosid E
Freie Aminosäuren	GABA Arginin u.a.
Amine	Acetylcholin

Der grüne Teil der Mistel enthält wasserlösliche Polysaccharide, die D-Galacturonane (MG 42 kD) und kleine Mengen Arabinogalaktan (MG von ca. 110 kD). In den Beeren finden sich überwiegend Arabinogalaktane mit 180-900 kD Molekulargewicht (Jordan und Wagner, 1986). Über die Zusammensetzung dieser Oligosaccharide ist nur wenig bekannt (Klett und Anderer, 1989).

5.1.4 Interaktion von Antigenen aus Mistelextrakten mit dem Immunsystem

Mistelextrakte wurden bislang häufig in die Gruppe von Krebs- bzw. Immun-Therapeutika mit vermeintlicher, jedoch nicht ausreichend nachgewiesener Wirksamkeit, eingeordnet. Um den Stellenwert der Mistel als Therapieform zu überprüfen, wurden in den vergangenen Jahren experimentelle und klinische Studien zur immunologischen und zytotoxischen Wirksamkeit der Mistelextrakte bzw. -inhaltsstoffe initiiert (Beuth et al., 1994).

Beuth et al. (1991) berichteten in einer Studie über eine deutliche Zunahme des Thymus- und in geringem Umfang auch des Milzgewichtes nach der Applikation von Mistelextrakt bei Mäusen. Die Gewichtszunahme war verbunden mit einer verstärkten Proliferation kortikaler Thymozyten. Bei Beuth et al. (1994) wurde nach subkutaner Verabreichung von ML-1 im Blut von Mäusen eine statistisch signifikant erhöhte Lymphozyten- bzw. Monozytenzahl und -aktivität beschrieben. Im niedrigen ML-1 Dosisbereich von 0.5 ng/kg KG war noch eine relevante immunstimulierende Wirkung nachweisbar, während höhere Dosierungen (2.5, 5.0 ng/kg KG) keine eindeutig immunaktivierende (z.T. jedoch auch immunsupprimierende) Wirkung zeigten und somit nicht mehr im Wirkungsoptimum lagen. Isoliertes ML-1 konnte nach den Ergebnissen von Luther et al. (1980) keine gesteigerte Proliferation der Lymphozyten induzieren. Franz (1986) fand einen leicht stimulierenden Einfluss der A-Kette des ML-1 auf Lymphozyten. In einer weiteren Studie wurde gefunden, dass alle drei Lektine in subtoxischen Konzentrationen die Synthese von $\text{TNF}\alpha$, sowie den Interleukinen $\text{IL-1}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und IL-6 in den Monozyten von gesunden Menschen stimulieren. Die effektiven Konzentrationen waren niedriger als 200 pg/ml für ML-1 und 20pg/ml für ML-2 und ML-3. Diese Beobachtungen zeigen, dass subtoxische Konzentrationen von ML-1 die Makrophagen bei Tieren und Menschen stimulieren können (Ribéreau-Gayon et al., 1996, Hajto et al., 1990). In einer anderen Studie wurde bei Tumorpatienten der Einfluss von ML-1 nach subkutaner Injektion auf die Zahl verschiedener Zellpopulationen untersucht. Dabei kam es nach vierwöchiger Therapie zu einem Anstieg der NK-, panT- und T-Helferzellen (Beuth et al., 1992). Stein und Berg (1996) berichten, dass die Applikation eines aus der Kiefernmistel hergestellten Extraktes (Iscador® Pini) eine starke Proliferation der peripheren mononukleären Blutzellen von Gesunden und besonders von Allergikern induzieren kann. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass dieser Mistelextrakt in einer Konzentration von 100 oder 1000 µg/ml T-Zellen (CD3^+) sowie besonders T-Helferzellen (CD4^+) und Monozyten (CD14^+) stimulierte. Darüber hinaus liess sich ein erhöhter Anteil aktivierter T-Zellen und T-Helferzellen (Expression des

IL-2 Rezeptors, CD25+) sowie aktivierter Monozyten nachweisen.

Die Bildung spezifischer anti-ML-1-Antikörper unter Misteltherapie wurde durch verschiedene Arbeitsgruppen eingehend untersucht. Danach neutralisieren Antikörper, die sich unter Misteltherapie entwickeln, die toxische Wirkung von Mistelextrakten, was die Verträglichkeit von Mistelextrakten auch in hohen Dosen erklärt (Stettin, 1992, Stettin et al., 1990). Es wurden auch die Auswirkungen einer therapeutischen Verabreichung von ML-1 auf den Serumspiegel bestimmter Akutphasenproteine von Tumorpatienten untersucht. Regelmässige subkutane Injektionen der immunmodulatorisch optimalen ML-1-Dosis (1ng/kg KG) riefen in der Untersuchung von Beuth et al. (1993) bei allen Patienten eine ausgeprägte Akutphasenreaktion hervor. Besonders signifikant war der Anstieg von C-reaktivem Protein, Haptoglobin, Coeruloplasmin, Komplementfaktor-C3, Albumin und IgM im Serum der Patienten (Beuth et al., 1993).

Oligo- und Polysaccharide sind in der Lage, in vitro die Zytotoxizität der NK-Zellen gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien zu steigern (Hamprecht und Anderer, 1990). Mit Hilfe des Carbon-Clearance-Tests gelang es, mit einem Polysaccharid aus Mistelbeeren eine erhöhte Phagozytose zu erzielen (Jordan und Wagner, 1986).

Tabelle 4: Darstellung der wesentlichen Einflüsse von Mistelextrakten und einzelner Inhaltstoffe auf das Immunsystem (Zusammenfassung von Tierversuchen¹ und Studien an Probanden oder an Patienten², nach Stein, 1995).

Stoff- gruppen	Allgemeine Effekte	Zelluläres Immunsystem	Humorales Immun- system	Zytoki- ne	Antitumor- ale Effekte
Mistel- extrakte	Thymus- gewicht ↑ ¹ Thymus- grösse ↑ ¹ Anschwe- llen der Tierpfote ¹	Phagozytose ↑ ^{1,2} LGL- Zahl ↑ ^{1,2} NK-Aktivität ↑ ^{1,2}	Antikörper- produktion ↑ ^{1,2} C-reaktives Protein Komple- ment- komponente C3↑ ²	IL-1 ^{1,2} IL-6 ^{1,2} TNF-α ²	Inhibition ¹ Tumor- zellzahl ↓

	Temperatur ↑ ^{1,2}	ADCC ↑ ² Neutrophilie ↑ ^{1,2} CD3+, CD19+, Th/Ts ↑ ² Lymphozyten- proliferation ↑ ^{1,2} Eosinophile Gr. ↑ ²		IFN-α ² IFN-γ ^{1,2} GM- CSF ² MIF ²	
Visco- toxine		Zytotoxizität humaner Lymphozyten ↑ CD8+ Zellzahl ↓			Nekroti- sierend
Mistel- lektin-1	Milzgewicht ↑ ¹ Thymus- gewicht ↑ ¹ Temperatur ↑ ¹	Mo/Ma Aktivierung ¹ Phagozytose ↑ ^{1,2} LGL-Zahl ↑ ¹ NK-Aktivität ↑ ^{1,2} Pan T-Zellen ↑ ² T-Helferzellen ↑ ² Neutrophile Gr. ↑ ¹ Lymphozyten- Proliferation ↓ ²	IgM ↑ ² C3 (Komple- ment) ↑ ² C-reaktives Protein ↑ ² Coerulo- plasmin ↑ ² Albumin ↑ ² Haptoglobin ↑ ²	IL-1 ² IL-6 ² TNF-α ² IFN-γ ^{1,2} IL-2 ²	Inhibition ¹ Antimeta- statisch

		IL-2R Expression ↑ ² HLA-DQ-/HLA- DR Expression ↑ ²			
Oligo- /Poly- saccha- ride		NK-Aktivität ↑ ² LAK-Aktivität ↑ ² Carbon- Clearance ↑ ²	Aktivierung des alterna- tiven Komple- mentweges	IFN- γ (T- Zellen) TNF- α (Mo/ Ma)	Anti-Tumor- Effekt bei Mäusen

5.1.5 Onkologische Grundlagenforschung zur Misteltherapie

Die Grundlagenforschung zur Mistelwirkung konzentrierte sich zunächst auf den Nachweis der zytotoxischen Wirkung von Mistelextrakten. Mit Hilfe von Tier- und Zellkulturversuchen konnte der toxische Einfluss sowohl der Extrakte, als auch der isolierten Mistellektine aufgezeigt werden (Dietrich et al., 1992). Erste umfangreiche Studien über die Einwirkung von Mistelextrakten auf tierische Tumorzellen führte Ende der dreißiger Jahre Koch (1938) durch. Nach intra- oder peritumoraler Injektion eines Mistelextraktes bei Mäusen beobachtete er in 47% der Fälle eine Dauerheilung von Erlich-Aszites-Karzinom. Dabei traten im Tumor Nekrosen auf, die nicht wesentlich auf das gesunde Gewebe übergriffen. Salzer (1986) fand nicht nur zytotoxische Effekte von Iscador® nach intrapleuraler Verabreichung bei pleuraler Carcinosis, sondern auch immunstimulierende Effekte. Ribéreau-Gayon et al. (1986) untersuchten den Einfluss von zwei verschiedenen Mistelextrakten auf in vitro kultivierte Leberzellen von Ratten und humane Leukemia-Molt 4-Zellen. Die Autoren konnten eine dosisabhängige Lyse der Zelllinien nachweisen. Ferner konnten sie mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskops die Auflösung der vorher intakten Zellmembran zeigen. Olsnes et al. (1982) stellten fest, dass der grösste Teil der zytotoxischen Aktivität des Mistelextrakts seiner Mistellektin-1-A-Kette zuzuschreiben ist, welche die ribosomale Untereinheit inaktiviert. Stirpe et al. (1980, 1982) stellten eine

inhibitorische Wirkung von ML1 (Viscumin) auf die Proteinsynthese fest. In der Arbeit von Janssen et al. (1993) wurde über In-vitro-Effekte von Mistelextrakten und Mistel-Lektin auf verschiedene Tumorzellen (P815, EI-4, Ke37, MOLT-4 und U937) berichtet. Weber et al. (1998) überprüften die Wirkungen des Mistelpräparates Lektinol (Madaus, Köln) auf metastatische B16-Melanomzellen in Lungen von Mäusen. Gemessen an der Zahl der Melanomzellen in Lungengewebschnitten bewirkte der eingesetzte Extrakt eine Verminderung der Metastasierung um 58 bis 95%. Parallel dazu wirkte Lektinol auch immunmodulierend. Eine Wirkung von ML-1 auf die humane Leukämiezell-Linie MOLT-4, die monozytäre Linie THP-1 und auf humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurde von Möckel et al. (1997) berichtet. Im niedrig toxischen Bereich zeigte ML-1 immunstimulierende Aktivität bei PBMC und THP-1-Zellen. Apoptose und Zytotoxizität konnten bei niedrigen und mittleren Konzentrationen nachgewiesen werden, während bei langen Inkubationszeiten und hohen Konzentrationen von ML-1 überwiegend nekrotisierende Effekte auftraten.

Die Reaktionen des Immunsystems auf die Applikation von Mistelextrakten wurde schon im Kapitel 5.1.4 beschrieben. Aus dem Dargestellten geht hervor, dass gerade das Zusammenspiel der verschiedenen beschriebenen Wirkprinzipien von Mistelinhaltsstoffen ein besonderer Vorteil dieser Krebsheilmittel sein könnte. Deshalb ist angesichts der sich mehrenden experimentellen Ergebnisse zu hoffen, dass durch genauere Kenntnis einzelner Substanzen und ihrer synergistischen Wirkungsweise weitere Fortschritte in der Anwendung von Mistelpräparaten erzielt werden können, die zu entsprechenden Verbesserungen der therapeutischen Ergebnisse führen könnten (Luther und Becker, 1986).

5.1.5.1 Pharmazeutik der verschiedenen Mistelpräparate

In der klinischen Pharmakologie ist bekannt, dass Behandlungsschemata in der Krebstherapie individuell angepasst werden müssen. Dies gilt insbesondere für die Therapie mit Mistelextrakten. Deshalb werden sehr differenzierte Präparateformen und Therapierhythmen angeboten (Verein für Krebsforschung, 1996). Alle Präparate sind zur parenteralen Gabe bestimmt und sind in 1ml oder 2ml-Ampullen erhältlich. Wenn Präparate in stufenweise eskalierender Dosis verabreicht werden sollen, werden oft auch sogenannte Serienpackungen angeboten. In diesen Packungen sind Ampullen mit verschiedenen steigenden Konzentrationen für die Einleitungstherapie enthalten. Verschiedene Arzneimittelhersteller bieten Mistelpräparate an, die sich teilweise durch die

Art der Herstellung unterscheiden. Im Folgenden sollen die auf dem Markt erhältlichen Präparate aufgeführt werden.

AbnobaViscum[®] (Abnoba, Pforzheim) ist ein Präparat aus den Presssäften der Mistel. Die Misteln werden zu definierten Zeitpunkten geerntet und verarbeitet. Durch ein spezielles Mischverfahren mit anschliessender besonderer Sterilfiltrierung wird eine stabile kolloidale Lösung erhalten. Das Herstellungsverfahren ist prozessstandardisiert. Das Präparat wird anschliessend nach eigenem Verfahren rhythmisch in Dezimalstufen potenziert. Die Zulassung nach dem neuen Arzneimittelgesetz für Tannenmistelextrakt der Potenzen D2 bis D5 wurde 1985 erteilt. Alle anderen Wirtsbäume und Verdünnungen wurden 1992 zur subkutanen Injektion zugelassen. Es stehen acht verschiedene Wirtsbaummistelpräparate zur Verfügung.

Eurixor[®] (Medisculap, Fellbach) ist ein wässriger Extrakt aus Mistelkraut, der im Verhältnis 1:1.3 verdünnt wird. Die Konzeption dieses Präparates geht auf Untersuchungen von Koch zur nekrotisierenden Wirkung der Mistelextrakte zurück. Es wird die Standardisierung auf Mistellektin I angestrebt. Das Präparat ist als Phytotherapeutikum erhältlich.

Ähnlichen Ursprungs und mit dem gleichen Verfahren hergestellt wird *Plenoso*[®] (Madaus, Köln). Um bei diesem Präparat gleichbleibende Qualität gewährleisten zu können, wird auf sogenannte „Nekroseeinheiten“ standardisiert.

Helixor[®] (Helixor, Rosenfeld) ist ein kaltwässriger Frischpflanzenextrakt. Die Misteln werden zu vier verschiedenen, definierten Zeitpunkten im Jahr geerntet und verarbeitet. Die Mischung der Sommer- und Wintersäfte geschieht in speziellen rotierenden Gefässen, in denen auch die Verdünnungen hergestellt werden. Das Präparat ist zur subkutanen Injektion zugelassen. Es stehen drei Präparationen verschiedener Wirtsbaummisteln gemäss den drei verschiedenen botanischen Subspezies der Mistel zur Verfügung.

Iscucin-Viscum[®] (Wala, Eckwälden) ist eine auf den Arzt Köller zurückgehende Präparation, die auf einer persönlichen Anregung Steiners aus dem Jahre 1924 basiert. Die Mischung von Sommer- und Winterextrakten der Mistel erfolgt mit Hilfe einer speziellen Apparatur. Das Präparat ist zur subkutanen Injektion bestimmt. Es stehen acht verschiedene Präparationen verschiedener Wirtsbaummisteln zur Verfügung.

Isorel[®] (in Deutschland: *Vysorel*[®]; *Novipharm, Pörtzschach, Pforzheim*) ist ein kaltwässriger Frischpflanzenextrakt, der sich ebenfalls aus Extrakten der Sommermistel und der Wintermistel zusammensetzt. Nach dem Mischprozess wird eine Sterilfiltration durchgeführt. Das Herstellungsverfahren ist prozessstandardisiert. Das Präparat ist zur subkutanen Injektion zugelassen. Es stehen drei Präparationen verschiedener Wirtsbaummisteln gemäss den drei verschiedenen botanischen Subspezies der Mistel zur Verfügung.

Lektinol[®] (Madaus, Köln) enthält nur Mistel-Lektin. Es basiert auf Untersuchungen, wonach mit standardisierten Gaben von 1 ng Mistellektin pro kg Körpergewicht eine optimale Dosis-Wirkungskurve zu erreichen sei.

Iscador[®] ist ein wässriger Mistelextrakt, der nach seiner Gewinnung einer Milchsäuregärung unterworfen wird. Die Misteln werden im Sommer und im Winter geerntet. Die Mischung des Extraktes aus Winter- und Sommermisteln geschieht in einer äusserst hochtourig rotierenden Maschine. Anschliessend wird die Rohmischung verdünnt. Das Präparat ist zur subkutanen Injektion bestimmt. Es stehen fünf verschiedene Präparationen verschiedener Wirtsbaummisteln zur Verfügung (Matthiessen und Tröger, 1995) .

Tabelle 5: Iscador® Präparate und Wirtsbäume der Rohsubstanz, (Weleda AG, 1999).

Viscum Mali (Apfelbaummistel)	Iscador® M
Viscum Pini (Kiefernmistel)	Iscador® P
Viscum Quercus (Eichenmistel)	Iscador® Qu
Viscum Ulmi (Ulmenmistel)	Iscador® U
Viscum Abietes (Tannenmistel)	Iscador® A

Bei den sogenannten Iscador® Spezial-Formulierungen handelt es sich um Präparate, die auf einen konstanten ML-1-Gehalt eingestellt werden. Die Angabe des Inhaltes erfolgt bezüglich der Menge des Gesamtextraktes mit dem Zusatz "spezial". Der Standard-Lektingehalt wird durch Auswahl und Mischen geeigneter Mistelextrakte eingestellt und mittels verbessertem ELLA-Test bestimmt. Bedingt durch unterschiedliche Wirtsbäume unterschieden sich die beiden Präparate hinsichtlich des Gehaltes ihrer Inhaltsstoffe (Verein für Krebsforschung, 1996).

Tabelle 6: Iscador® Spezial-Formulierungen.

Iscador® M 5 mg spezial	Gesamtlektin 250 ng/ml Mistellektin I (ML I) 80 ng/ml
Iscador® Qu 5 mg spezial	Gesamtlektin 375 ng/ml

5.1.5.2 Methodik des Einsatzes

Die Iscador®-Therapie erfolgt nach den Anwendungshinweisen in der Regel rhythmisch mit ansteigenden und dann wieder abfallenden Extrakt-Konzentrationen und wird der individuellen Antwort (Reaktion) des Patienten sowie der Art der Krebserkrankung, der Lokalisation und dem Tumorstadium angepasst. Wesentlich für die Behandlung ist die stufenweise Steigerung der Konzentration der subkutan zu verabreichenden Injektionen,

die im Rahmen einer Serie gegeben werden. Es gibt vier Serien mit unterschiedlich hohen Anfangs- und Endkonzentrationen, jede Serie besteht aus 14 Ampullen, die sich in zwei identische Halbserien mit 7 Ampullen aufteilen.

Tabelle 7: Auflistung der Ampullenserien von Iscador®, (Weleda AG, 1999).

	2 Ampullen	2 Ampullen	2 Ampullen
Serie 0	0.01 mg	0.1 mg	1 mg
Serie I	0.1 mg	1 mg	10 mg
Serie II	1 mg	10 mg	20 mg
Serie III	10 mg	20 mg	30 mg

Die Injektion erfolgt subkutan. Als Injektionsort empfiehlt sich die Tumornähe oder die Nähe des Gefährdungsgebietes. Falls die Injektion im angegebenen Gebiet für den Patienten subjektiv zu belastend oder nicht durchführbar sein sollte, kann man auf die üblicherweise für die subkutane Injektion zur Verfügung stehenden Körperregionen, wie Bauchregion, den Oberschenkel oder den Oberarm ausweichen. Bei malignen intraserösen Ergüssen kann Iscador® intrapleural oder intraperitoneal instilliert werden. Die Dauer der Therapie ist wegen der geringen Toxizität der Mistelextrakte nicht prinzipiell begrenzt. Sie sollte sich in der Nachsorge nach dem Rezidivrisiko richten. Im Allgemeinen wird empfohlen, nach fünf Jahren die Pausen zu verlängern und die Therapie auszuleiten. Bei allgemein guter Verträglichkeit sind entzündliche Lokalreaktionen um die Einstichstelle, Erhöhung der Körpertemperatur, in seltenen Fällen allgemein allergische Reaktionen bekannt (Verein für Krebsforschung, 1996).

5.1.5.3 Klinische Anwendung von Mistelpräparaten in der Praxis

Therapeutika, die auf Mistelbasis hergestellt werden, sind bei einer ganzen Reihe von Erkrankungskomplexen indiziert. So wird nach Wichtl (1984) Misteltee empirisch als Adjuvans in der Therapie des Bluthochdruckes, bei Schwindelgefühl und Blutandrang zum Kopf verwendet. Mit der Frage, ob eine Therapie mit Mistelextrakten den arteriellen Blutdruck senken kann, beschäftigen sich mehrere Arbeiten (Jarisch und Richter, 1940, Pora et al., 1957, Luther und Becker, 1986). In der sogenannten Volksmedizin werden Mistelextrakte daneben bei Amenorrhoe und Gelenkserkrankungen empfohlen (Luther und Becker, 1986).

Nach ärztlichen Beobachtungen und Erfahrungen haben sich in der klinischen Anwendung verschiedene Indikationen für die Misteltherapie gegen den Krebs ergeben:

- Operationsvor- und -nachbehandlung bei verschiedenen Stadien von Collum-, Ovarial-, Vaginal-, Mamma-, Magen-, Colon-, Bronchial-, und anderen Karzinomen (Weleda AG, 1999). Auch eine später einsetzende Nachbehandlung mit dem Mistelextrakt Iscador® soll die rezidiv- und metastasenfreie Überlebenszeit verlängern. Es wurde über eine Verminderung der Nebenwirkungen und eine Verbesserung der Lebensqualität berichtet. Bei Mammakarzinomen, die oft sehr spät metastasieren, ist eine sehr lange Therapie von teilweise über 20 Jahren anzustreben (Matthiessen und Tröger, 1995).
- Adjuvans zur Chemo- und Strahlentherapie
Hierdurch werden die unerwünschten Nebenwirkungen dieser Therapie gemildert (Weleda AG, 1999). Besonders nach Beendigung einer Chemo- oder Bestrahlungstherapie lassen sich verstärkte Reaktionen auf Mistelextraktgaben beobachten, die durch den Wegfall der durch die Primärtherapie bedingten Immunsuppressionen bedingt sind (Matthiessen und Tröger, 1995).
- Inoperable Tumoren, Rezidive und Metastasen
Metastasen werden mit dem gleichen Präparat behandelt wie der Primärtumor. Unter Iscador®-Therapie werden neben der meist auffallenden Besserung des Allgemeinzustandes und der analgetischen Wirkung häufig ein Wachstumsstillstand, gelegentlich auch eine Regression von Tumoren beobachtet. So können eventuell inoperable Tumoren wieder einen operablen Zustand übergeführt werden.
- Intracranielle und intraspinale Tumoren
- Leukämien
- Lymphogranulomatose und Non-Hodgkin-Lymphom
- Plasmozytom
- Präkanzerosen, wie z.B. Kraurosis vulvae, Proliferierende Mastopathiae Stad. III, Papillomatose der Blase, Polyposis der Darnes, Ulcus callosum des Magens und Sarkome (Weleda AG, 1999)

5.1.5.4 Resultate des Einsatzes

Seitdem Mistelextrakte zur Behandlung von Krebs in Deutschland und der Schweiz verwendet werden, wurde ihre Wirkung in klinischen Studien und Fallbeispielen geprüft

und dargelegt (Stein, 1995, Stein et al., 1999, Hajto, 1986, Hajto et al., 1989, 1990, Hajto und Lanzrein, 1986, Wagner, 1996). Trotz vieler Probleme in der Aussage von randomisierten, prospektiven und kontrollierten Studien, werden diese von onkologischer Seite heute weiterhin als gültiges Kriterium für die Wirksamkeit eines Medikaments betrachtet. Aus ethischen Gründen ist es den meisten mit Mistelpräparaten arbeitenden Kliniken nicht möglich, ein Präparat, das den Patienten erfahrungsgemäss hilft, bei einem Teil der Patienten durch ein Placebo zu ersetzen (Luther und Becker, 1986).

In der Literatur finden sich in den letzten Jahren vermehrt Studien zum Einsatz von Mistelpräparaten bei nicht-tumorösen Erkrankungen. So berichten Chernyshov et al. (1997) und Lukyanova et al. (1994) über klinische und immunologische Effekte des Einsatzes von Iscador® bei Kindern mit Atemwegserkrankungen nach radioaktiven Verstrahlungen im Zuge der Tschernobyl-Katastrophe, während Stoss et al. (1999) und Gorter et al. (1996) die therapeutische Verabreichung von Iscador® bei HIV-positiven Patienten prüften.

Chernyshov et al. beobachteten bei Kindern unter Behandlung eine signifikante Zunahme der Lymphozytenzahl und Haupt-Lymphozytensubpopulationen (CD3, CD19, CD3-/CD16+CD56+) statt. Neben einer signifikanten Zunahme der niedrigen Werte der Zellpopulationen, verursachte Iscador® M auch eine Senkung der erhöhten Werte der CD4/CD3- und CD3/CD8-Quotienten auf das Normalniveau, hingegen keine Veränderungen bei Kindern mit vormalig normalen Werten. Die Autoren sprechen daher von einer eher immunoregulierenden Eigenschaft von Iscador® M. Um die Injektionsstelle herum zeigte sich eine rötliche Schwellung, die nach wenigen Stunden verschwand. Allgemeinbefinden, Müdigkeit, Schwitzen, Appetit und Schmerzen verbesserten sich. Lukyanova et al. berichten über eine Erhöhung von CD3-Lymphozyten, Phagozytose, IgM, IgA und Komplement C4. Die Autoren verzeichneten auch eine Erhöhung des allgemeinen Wohlbefindens sowie eine Abnahme der vorher bestehenden Müdigkeit und Appetitlosigkeit. An der Injektionsstelle erschien bei 5 von 25 Kinder Hyperämie von max. 3 cm.

Ein anderer Versuch umfasste HIV-positive Patienten und gesunde nicht-rauchende Probanden (Stoss, 1999). Effekte der Anwendung der Mistellextrakte (Iscador® Qu Spezial Viscum und Viscum Album QuFrF) auf das Immunsystem zeigten sich durch eine Zunahme der D3-/25-Lymphozyten und Antikörper gegen Mistellektin. Erythema an der Injektionsstelle war das am häufigsten berichtete Begleitsymptom. Gorter et al. (1996) berichten über eine prospektive, longitudinale, randomisierte Studie mit den Präparaten Iscador® QuFrF

(unfermentierter Eichenmistelpresssaft) und Iscador® Qu Spezial HIV-positiven Patienten, Krebspatienten und gesunden, nichtrauchenden Probanden. Bei fast allen HIV-positiven Probanden blieb der Wert von CD4, wie auch das Verhältnis CD4/CD8 über 15 Monate stabil. Die CD3/25-positiven Lymphozyten (Produktion von IL-2) zeigten in allen Gruppen einen signifikanten Anstieg. Beide Präparate hatten ähnliche Wirkung auf die Produktion von IL-2 HIV-positiven Patienten. Sowohl Iscador® QuFrF als auch Iscador® Qu Spezial wurden gut vertragen, es wurden auch keine toxischen Nebenwirkungen beobachtet. Bei 76% der HIV-positiven Teilnehmer verbesserte sich die Lebensqualität.

5.2 Mastitis

5.2.1 Bedeutung der Mastitis des Rindes

Die bovine Mastitis verursacht weltweit grosse ökonomische Verluste in der Milcherzeugung. Diese werden hervorgerufen durch die entzündungsbedingte verringerte Milchproduktion, durch die behandlungsbedingte Liefersperrfrist, während der die Milch nicht verkehrsfähig ist sowie durch vorzeitige Schlachtung therapieresistenter Tiere in Verbindung mit den Behandlungskosten und vermehrtem Arbeitsaufwand (Nickerson, 1985). Ungeachtet der dem Mastitisgeschehen zugrunde liegenden Krankheitserreger spielen dabei nicht nur klinische, sondern vor allem subklinische Mastitiden eine grosse epidemiologische Rolle, da diese Fälle eine entscheidende Quelle für Übertragungen der Infektion innerhalb der Herde darstellen (Brown und Scasserra, 1990).

Nach Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG, 2002) betragen die mastitisbedingten ökonomischen Verluste in Deutschland pro ca. 300 Euro je erkranktem Tier und Jahr. Hamann (2002) bezifferte den Gesamtverlust für Deutschland von 0,75 - 1 Milliarde Euro pro Jahr. Nach einer Untersuchung von Danuser und Gaillard (1990) an 612 ausgewählten Betrieben in der Schweiz wurden zwischen 8.4% und 13.8% der Kühe aufgrund von Euterproblemen tierärztlich behandelt. Rüschi (2000) erläutert, dass 20% der Kühe in der Schweiz an akuter und 25% an chronischer Mastitis erkrankt sind, während 15% der Kühe wegen Eutererkrankungen ausgemerzt werden. Der mastitisbedingte Schaden in der Schweiz wird vom Autor auf etwa 260 Millionen Franken pro Jahr geschätzt. In der Studie von Gröhn et al. (1998) wurden die krankheitsbedingten Abgangsursachen bei 7523 Kühen untersucht. Dabei wurde die Mastitis als Hauptursache für das Ausscheiden aus der Herde identifiziert (14.5%). Andere Erkrankungskomplexe lagen in ihrer Bedeutung als Abgangsursachen teilweise deutlich dahinter. Hierbei waren

zu nennen Ovarialzysten (10.6%), Retentio Secundinarum (9.5%), Dislocatio Abomasi (5.3%), Ketose (5.0%), Endometritis (4.2%) und MilCHFieber (0.9%).

5.2.2 Formen der Mastitis

Als Mastitis wird die Entzündung der Milchdrüse in der Gesamtheit ihrer milchbildenden, speichernden und ableitenden Abschnitte bezeichnet (Wendt et al., 1994). Bei bakteriell bedingten Mastitiden handelt es sich um einen invasiven Prozess, wobei es nach Infektion und Vermehrung der Bakterien zu fortschreitender Schädigung des Gewebes durch die Gesamtaktivität der Virulenzfaktoren der Bakterien kommt. Das Ausmass dieser Gewebsschäden sowie die entzündlichen Reaktionen des Wirtes variieren zwischen den einzelnen Erreger-Stämmen, so dass die typischen Entzündungsmerkmale (Schwellung, Wärme, Rötung, Schmerz und Funktionsstörungen) ausgebildet werden (Kasche, 1995). Die Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (1994) unterteilt die Mastitis primär in die üblicherweise auftretende subklinische, klinische und chronische Form. Die klinische Mastitis kann weiter in eine akute und subakute Form unterteilt werden. Eine akute Mastitis besteht bei offensichtlichen Entzündungssymptomen des Euters. Die Milch ist makroskopisch verändert, und die Tiere zeigen häufig Fieber. Währenddessen treten bei der subakuten Mastitis Flocken in der Milch ohne zusätzliche klinische Symptome des Euters auf. Bei der subklinischen Form sind weder die Milch noch das Eutergewebe sichtbar verändert, sie lässt sich nur labordiagnostisch durch Erregernachweis und Bestimmung des Gehaltes an somatischen Zellen nachweisen. Die subklinische Mastitis ist die in der heutigen landwirtschaftlichen Milcherzeugung vorherrschende Form der Euterenzündung. Ihr kommt aus milchhygienischer Sicht eine besondere Bedeutung zu, da die Milch subklinisch kranker Kühe als Konsummilch verkauft wird (Tolle, 1983). Eine chronische Mastitis ist durch längerfristiges Nichtansprechen auf therapeutische Massnahmen zu charakterisieren. Betroffene Euterviertel können zur Atrophie neigen oder zeitlebens anomale klinische Befunde aufweisen.

Der Nachweis entzündlicher Veränderungen der Milchdrüse erfolgt zumeist über die Bestimmung der Anzahl somatischer Zellen sowie über bakteriologische Analysen im Milchsekret. Man kann davon ausgehen, dass bereits bei einem Gehalt von 100.000 Zellen/ml Milch die normale zelluläre Abwehr in eine entzündliche Reaktion übergegangen ist (Reichmuth, 1975, Hamann und Reichmunth, 1990), wobei bei Sekreten mit darüber hinausgehenden Zellgehalten Änderungen in der Milchezusammensetzung eine deutliche Störung der Sekretionsfunktion anzeigen (Urech et al., 1998). Es kommen jedoch weitere Substrate und physikalisch-chemische Parameter zur Beurteilung des entzündlichen

Geschehens im Euter in Betracht wie Gehalte an Adenosin-Triphosphat (ATP), bovinem Serumalbumin (BSA), Elektrolyten (Natrium, Chlorid), Laktose, und einigen spezifischen Enzymen, sowie die elektrische Leitfähigkeit und der pH Wert. Von diesen Faktoren ist die elektrische Leitfähigkeit von besonderem Interesse (DVG, 1994).

Entsprechend der Befunde zytologischer und bakteriologischer Untersuchungen von Viertelanfangsgemelksproben wird von der DVG (1994) folgendes Schema zur Klassifizierung der Eutergesundheit vorgeschlagen (siehe Tab. 8).

Tabelle 8: Beurteilung zyto-mikrobiologischer Befunde im Rahmen der Mastitis-Kategorisierung in Anlehnung an die DVG (1994).

Zellgehalt pro ml Milch	Euterpathogene Mikroorganismen	
	nicht nachgewiesen	nachgewiesen
< 100.000	Normale Sekretion	latente Infektion
> 100.000	Unspezifische Mastitis	Mastitis

Eine latente Infektion liegt vor, wenn sich die Zellzahl in der Norm bewegt, jedoch Mastitiserreger nachgewiesen werden (DVG, 1994, Tolle, 1983). Bei einer unspezifischen Mastitis (DVG, 1994) oder einer Sekretionsstörung (Tolle, 1983) werden keine Infektionserreger nachgewiesen und es liegen subklinische oder klinische Symptome vor.

5.2.3 Mastitiserreger

Die für eine Mastitis bei Rind ursächlich in Frage kommenden Erreger sind sehr zahlreich, wenngleich nur einige wenige in der Mehrzahl der Mastitissekrete gefunden werden. Diesem Spektrum entsprechend konnten Wilson et al. (1997) in einer Untersuchung bei 105.083 Kühen in den USA die Gattungen *Streptococcus* (Sc.) *agalactiae* (10.1%), *Streptococcus* sp. (7.3%), *Staphylococcus* (St.) *aureus* (9.1%), *Staphylococcus* sp. (11.3%), *Escherichia coli* (0.4%), *Klebsiella* sp. 0.2%, *Pseudomonas* sp. 0.1% und *Serratia* sp. 0.1% ermittelt werden. Daneben wurden noch zu geringen Anteilen Hefen (0.1%) und Schimmelpilze (<0.1%) nachgewiesen. Insgesamt waren nur ca. die Hälfte aller Euterentzündungen nachweislich erregerbedingt. Dieses Erregerspektrum ist in den letzten 20 Jahren zwar ähnlich geblieben, hat sich quantitativ aber stark verändert. Während die Prävalenz von *Sc. agalactiae* abnahm, nahm die Häufigkeit der Mastitis verursacht durch *St. aureus*, durch umweltpathogene Erreger und Koagulase-negative Staphylokokken deutlich zu (Myllys et al., 1994, Ruffo und Zeconi, 1994). In der Schweiz ist nach

Schällibaum (1999) die Verbreitung von *Sc. agalactiae* mittlerweile unbedeutend, während beispielsweise in den USA nach Untersuchungen von Dodd (1983) noch vor 20 Jahren um die 90% aller bovinen Mastitiden durch *St. aureus* und *Sc. agalactiae* verursacht wurden. Euterinfektionen mit Streptokokken und Staphylokokken können durch verschiedene Spezies hervorgerufen werden, die zur Milchdrüse eine unterschiedliche Affinität haben und diagnostisch durch eine Reihe spezieller Methoden differenzierbar sind (Wendt et al., 1994). Pathogenität und Virulenz der Krankheitskeime variieren erheblich je nach Spezies, Typ und Standortvariante (Schalm, 1977, Wendt et al., 1994).

5.2.3.1 Staphylokokken als Mastitiserreger

Staphylokokken-bedingte Euterinfektionen erfolgen am häufigsten durch koagulasebildende *Staphylococcus aureus*, selten durch die ebenfalls zu den koagulase-positiven Staphylokokken gehörenden *St. intermedius* und *St. hyicus* spp. *hyicus* (Wendt et al., 1994). *St. aureus* und *St. intermedius* kommen häufig in der Umwelt vor und sind, nicht nur bei euterkranken, sondern auch bei eutergesunden Tieren auf der Euterhaut und in kleinen Verletzungen an den Zitzen zu finden (Wendt et al., 1994, Anderson, 1982). *St. aureus* ist auch einer der Haupterreger klinischer Mastitiden im praepartalen oder frühen postpartalen Zeitraum bei Rindern (Fox et al., 1995, Nickerson et al., 1995).

Wilson et al. (1997) wiesen Staphylokokken bei 20% der untersuchten Kühe nach. Unter denen konnte *St. aureus* als ursächlicher Erreger bei 42% der Kühe ausgewiesen werden. Rossetti (1993) fand in Argentinien in 54% der Proben von subklinisch an Mastitis erkrankten Tieren *St. aureus*. Miltenburg et al. (1996) konnten in Milchproben *St. aureus* bei 14% der Kühe in der ersten Laktation nachweisen, während die Prävalenz bei älteren Kühen mit 24% höher war.

Die hohe Pathogenität von *St. aureus* im Euter ist durch eine Vielzahl von extrazellulären Toxinen und Enzymen bestimmt, welche in Tabelle 9 aufgeführt sind.

Tabelle 9: Virulenzfaktoren von *St. aureus*, (Kasche, 1995).

Zellgebundene Faktoren	Extrazelluläre Toxine	Extrazelluläre Enzyme
Kapsel	α -Toxin	Koagulase
Protein A	β -Toxin	Staphylokinase
Gebundene Koagulase	γ -Toxin	Hyaluronidase
Mukopeptide	δ -Toxin	Protease(n)
Teichonsäure	Enterotoxin	DNAse
	Epidermolytisches Toxin (Exfoliatives Toxin)	Lipase
	Leukozidin	Eigelfaktor

Aus der Milch, die bei bovinen Mastitiden gewonnen wurde, zeigten in den Untersuchungen von Matsunaga et al. (1993) nach Auswertung von Blutagarplatten 74% der Kulturisolate eine α -Toxinbildung. Die zellschädigende Wirkung des α -Toxins beschränkt sich auf Blut- und Gewebezellen, die von der lytischen Wirkung betroffen sind. Neben elektronenmikroskopisch sichtbaren, morphologischen Zellveränderungen als zytotoxisches Merkmal wird auch eine reduzierte Lebensfähigkeit der Zielzellen zur Bestimmung herangezogen (Galanti et al., 1968). Bei Untersuchungen boviner *St. aureus*-Isolate mastitis-erkrankter Tiere waren nach Matsunaga et al. (1993) 65,5% dieser Isolate zur Bildung von β -Toxin befähigt, bei perakut verlaufenden Mastitiden konnte in allen Fällen dieses Toxin nachgewiesen werden. In der gleichen Untersuchung wurde in 12% der Mastitis-isolate ein δ -Toxin gefunden. Nur bis zu 15% der Staphykokkenstämme aus der Milch mastitis-kranker Kühe produzieren nach Garcia et al. (1980) Enterotoxine. Matsunaga et al. (1993) beziffern die Nachweisrate für dieses Toxin hingegen auf 34,5% und in perakuten Fällen sogar auf 100%. Das Toxin wirkt mitogen auf T-Lymphozyten und induziert die Bildung von Zytokinen (Grossmann et al., 1990).

Loeffler (1986) beobachtete nach der intramammären Applikation von Leukozidin eine Entzündungserscheinung in Form eines signifikanten Anstiegs des Zellgehalts. Protein A sowie gebundene Koagulase oder Clumping Faktor werden nach den Untersuchungen von Matsunaga et al. (1993) bei persistierenden Mastitiden produziert.

Als koagulasenegative Staphylokokken (CNS) werden verschiedene Arten zusammengefasst. Deren häufigste Vertreter sind: *St. haemolyticus*, *St. simulans*, *St. hominis*, *St. epidermidis*, *St. capitis*, *St. hycius* spp. *hycius*, spp. *chromogenes*, *St. cohnii*,

St. warneri, *St. xylosum*, *St. carnosus* (Wendt et al., 1994). Rainard et al. (1990) berichten in einer Studie, dass durchschnittlich etwa 26% der Tiere mit erhöhter somatischer Zellzahl in der Milch mit CNS infiziert waren, während 38% der CNS-infizierten Euterviertel Werte über 500.000 Zellen/ml erreichten.

In der Studie von Trinidad et al. (1990) waren die am häufigsten isolierten Arten aus der Milch und dem Keratin des Zitzenkanals neben *St. aureus* (mit 19.9% bzw. 16.8%) *St. chromogenes* (43.1% bzw. 42.9%) und *St. hyicus* (24.3% bzw. 25.2%). Die am meisten isolierten pathogenen Erreger in der Milch von klinischen Mastitiden waren in der gleichen Studie *St. chromogenes* (35%), *St. aureus* (22%) und *St. hyicus* (17%), wohingegen Jarp (1991) *St. simulans* als die CNS-Art diagnostizierte, die am häufigsten für klinische und subklinische Mastitiden verantwortlich ist. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Birgersson et al. (1992).

5.2.3.2 Streptokokken als Mastitiserreger

Von den verschiedenen Streptokokkenarten sind die drei Spezies *Sc. agalactiae* (Serogruppe B), *Sc. dysgalactiae* (Serogruppe C) und *Sc. uberis* (Serogruppe E) am häufigsten für Mastitiden beim Rind verantwortlich. *Streptococcus agalactiae* als spezifisch an das Euter angepasster Erreger verursacht in der Regel subklinische Mastitiden, die besonders postpartal akut aufflackern können (McDonald, 1984). Die Milchdrüse wird dabei zumeist beim Melken über die Melkzeuge, Eutertücher und die Hände der Menschen infiziert. Der Erreger ist fähig, sehr lange in der Milchdrüse von Milchrindern zu überleben. Da er sehr empfindlich auf Antibiotika reagiert, kann er leichter als andere pathogene Erreger aus der Herde mittels Antibiotika eliminiert werden (Edmondson, 1989).

In einer Studie von Yamagata et al. (1987) konnte bei 17% der Kühe *Sc. agalactiae* als bakterieller Befund in den Milchproben angegeben werden. Der antibiotisch bedingte Therapieerfolg mit Penicillin während der Trockenstehperiode lag bei 98%. In verschiedenen Studien wurden diverse Spezies von sogenannten Umweltstreptokokken aus der bovinen Milchdrüse isoliert. Zu ihnen gehören als wichtigste Vertreter *Sc. uberis* und *Sc. dysgalactiae*, welche die am häufigsten im Euter vorkommenden pathogenen Erreger darstellen (Hillerton et al., 1995, Oliver et al., 1997). Daneben konnten andere Arten wie *Sc. equinus*, *Sc. parauberis*, *Sc. canis*, *Sc. alactolyticus*, *Sc. acidiminis*, *Sc. equi* sowie einzelne Enterokokkus-Stämme nachgewiesen werden (Watts, 1988).

Umweltstreptokokken sind nach Hillerton et al. (1993) für ungefähr zwei Drittel der Mastitisfälle in Grossbritannien verantwortlich. Nach Untersuchungen von Todhunter et al. (1995) treten die Hälfte der Neuinfektionen bedingt durch Umwelt-Streptokokken während

der Trockenperiode und die andere Hälfte während der Laktation auf. Die Neuinfektionsrate lag in dieser Studie im ersten Monat der Laktation am höchsten. Die Infektionsrate in späteren Laktationsphasen war bei älteren Kühen höher als bei Färsen oder Kühen in der zweiten Laktation.

Sc. uberis gilt als einer der häufigsten Erreger für Euterentzündungen bei Kühen. Prophylaktische Massnahmen, welche normalerweise bei anderen pathogenen Mastitisserregern angewandt werden, sind nach Matthews und Oliver (1993) sowie Almeida und Oliver (1993) für die Kontrolle von *Sc. uberis*-Mastitiden nicht effektiv. Der Grund liegt vermutlich in besonderen epidemiologischen und pathogenetischen Faktoren dieses Erregers, wie z.B. der Fähigkeit der Einkapselung (Matthews und Oliver, 1993, Almeida und Oliver, 1993), Invasion und Adhärenz an Epithelzellen, der Bindung an extrazelluläre Matrixproteine (Almeida et al., 1996) und dem Besitz eines plasminogenen Aktivators (Leigh, 1993). Streptokokken, wie z.B. *Sc. uberis*, sind resistenter gegen antibakterielle Effekte von Laktoferrin als Gram-negative Bakterien (Nonnecke und Smith, 1984, Todhunter et al., 1985). Nach Weinberg (1978) spielt dabei ihr geringer Eisenbedarf eine entscheidende Rolle. Nach experimenteller intramammärer Inokulation von *Sc. uberis* stellten McDonald and Anderson (1981) fest, dass alle Milchdrüsen im Versuch am Anfang der Trockenstellperiode resistent gegenüber Neuinfektionen waren. Die Mastitisanfälligkeit nahm während der Trockenstehperiode bis zum 21. Tag zu, bis zu dem sich etwa 80% der Euter als infektionsanfällig erwiesen. Während der zweiten Hälfte der Trockenstehperiode tendierten alle Milchdrüsen zur Infektionsanfälligkeit gegenüber *Sc. uberis*. Das Auftreten von Milchdrüseninfektionen durch *Sc. uberis* wird vor allem am Anfang der Laktationsperiode beschrieben (McDonald, 1984). Das Wachstum von *Sc. uberis* in Milch wird *in vitro* durch das Lactoperoxidase-Thiocyanat-Wasserstoffperoxid-System verhindert. Da das System während der Trockenstehperiode fehlt, ist die Milchdrüse zu diesem Zeitpunkt vermehrt infektionsanfällig (Marshall et al., 1986).

Der durch *Sc. uberis* bedingte Anteil an allen klinischen Mastitiden liegt in verschiedenen Studien zwischen 17 und 33% (Bramley und Dodd, 1984, Hillerton et al., 1993), wobei in den USA von Jayarao et al. (1999) eine Infektionsrate von 12-16% der Kühe mit subklinischen Mastitiden ermittelt wurde. Hierbei stieg die Prävalenz mit zunehmenden Alter an.

5.2.4 Faktoren der unspezifischen und spezifischen Abwehr

5.2.4.1 Faktoren der unspezifischen Abwehr

Die unspezifische Abwehr in der Milchdrüse wird durch verschiedene Faktoren bestimmt, die nachfolgend im einzelnen beschrieben werden (Sordillo et al., 1997, Jain, 1979, Schalm, 1977).

Der Zitzenkanal ist mit seinem Schliessmuskel die erste Barriere, die den Eintritt von Mikroorganismen begrenzt (Nickerson, 1985). Das im Strichkanal befindliche, wachsartige Keratin enthält Fettsäuren und Proteine, die bakterizid auf die pathogenen Mikroorganismen wirken und so das bakterielle Eindringen über den Zitzenkanal in das Hohlraumssystem des Euters verhindern (Nickerson, 1988). Das Keratin verschliesst das Zitzenende innerhalb von 2 bis 3 Wochen nach dem Trockenstellen am Ende der Laktation und bewirkt so eine Barriere für die Milchdrüse gegenüber potentiell eindringenden Keimen.

Laktoferrin ist ein eisenbindendes Protein, das von Epithelzellen und Leukozyten produziert wird. In Anwesenheit von Bikarbonat entzieht es den Bakterien das benötigte Eisen und verhindert so das Wachstum bestimmter Arten, wie Staphylokokken und coliformer Keime. Sc. agalactiae kann hingegen Laktoferrin selbst als Eisenquelle verwenden. Zusätzlich kann dieses Protein die Abwehr durch Makrophagen erhöhen, indem es die Produktion des bakteriellen Enzyms Dismutase verhindert, welche Superoxidradikale inaktiviert (Sordillo et al., 1997). Durch Komplexbildung mit IgG₂ fördert Laktoferrin die Opsonierung und wirkt bakteriostatisch durch seine Anlagerung an die Oberfläche lysozymgeschädigter Bakterien (Wendt et al., 1994). In der gesunden Milchdrüse ist die Konzentration des Laktoferrins niedrig, jedoch zunehmend höher während der Trockenperiode und bei Entzündungen der Milchdrüse (Sordillo et al., 1997).

Neutrophile Granulozyten sind die wichtigsten Zellen im frühen Stadium der Entzündung, sie machen mehr als 90% der weissen Blutzellen in der Milchdrüse aus (Sordillo et al., 1989). Ihre Abwehrfunktion besteht in der Phagozytose von eingedrungenen Infektionserregern. In der Milch gesunder Euterviertel beträgt ihr Anteil an der Gesamtzellzahl zwischen 12 und 61% (Rolle, 1993). Sie wandern aus dem Blut in die Milchdrüse als Antwort auf bakterielle Bestandteile oder Enzyme, die von beschädigten sekretorischen Zellen freigegeben werden, sowie auf einige Entzündungsmediatoren wie Zytokine, Komplementfaktoren und Prostaglandine (Selsted et al., 1993).

Makrophagen sind die überwiegende Zellart (48%) in der Milch und im Gewebe der

gesunden Milchdrüse. Sie können Bakterien, Epithelzelltrümmer und akkumulierte Milchbestandteile phagozytieren. Weil sie auch Fett, Kasein und andere Milchbestandteile aufnehmen können, sind sie gegenüber Mikroorganismen weniger wirkungsvoll als die Blutleukozyten, besonders während des peripartalen Zeitraumes, in dem die Milch eine hohe Konzentration an Milchinhaltsstoffen aufweist (Paape et al., 1981).

Natural-Killer-(NK)-Zellen sind grosse, granulierte Lymphozyten, die zytotoxische Fähigkeit besitzen. Sordillo et al. (1991a) konnten zeigen, dass lymphoide Zellen, die aus der Milchdrüse des Rindes isoliert wurden, eine ähnliche Aktivität wie NK-Zellen besitzen. Nach der Stimulation mit IL-2 wiesen sie eine erhöhte bakterizide Fähigkeit gegen *St. aureus* auf. Das impliziert, dass sie eine wichtige Rolle bei der Beseitigung von pathogenen Erregern spielen.

Des Weiteren produzieren die Abwehrzellen der Milchdrüse nach Kontakt mit einem Antigen, z.B. einem eingedrungenen Bakterium, Zytokine. Zytokine sind Regulationsproteine, die bei Entzündungsvorgängen und anderen Abwehrmechanismen von grosser Bedeutung sind. Nach Aktivierung der Zellen durch verschiedenartige Stimuli bilden sich diese löslichen Moleküle und binden an spezifische Rezeptoren der Zielzellen (Silberstein et al., 1986).

Tabelle 10: Übersicht über die Zytokine und die Zytokineffekte auf Immunzellen in der Milchdrüse, (Sordillo et al., 1997).

Zytokine	Effekte
Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF)	Erhöhte Zellzahl Zunahme der neutrophilen Granulozyten in der Milch
Granulocyte Monocyte-CSF (GM-CSF)	Erhöhte bakterizide und chemotaktische Aktivität der neutrophilen Granulozyten Erhöhte zytotoxische Aktivität
Gamma-Interferon (IFN- γ)	Erhöhte Phagozytose und bakterizide Aktivität der neutrophilen Granulozyten Erhöhte bakterizide Aktivität Effektives Mastitis-Vakzineadjuvant
Interleukin 1 (IL-1)	Zunahme der neutrophilen Granulozyten
Interleukin 2 (IL-2)	Erhöhte zytotoxische und bakterizide Aktivität der Lymphozyten Zunahme der Plasmazellen Zunahme der Mononukleären Zellen in der Milchdrüse Effektives Mastitis-Vakzineadjuvant

Colony Stimulating Factors (CSF) sind eine Gruppe von Zytokinen, die für die Vermehrung und Differenzierung der hämatopoetischen Zellen verantwortlich sind. Sie werden durch eine Vielzahl von Zellen, einschliesslich Fibroblasten, Endothelzellen, Makrophagen und T-Zellen produziert. Granulocyte-CSF (G-CSF) wird für das Wachstum, das Überleben und die Differenzierung der Granulozyten benötigt, eine klinische Anwendung von G-CSF in der Mastistherapie ermöglichen könnte (Nickerson et al., 1989). Granulocyte Monocyte-CSF (GM-CSF) ist unter anderem für das Wachstum der ausgereiften Granulozyten sowie für die Aktivierung und Ausreifung der Monozyten/Makrophagen wichtig. Die Behandlung der Milchdrüse mit rekombinantem GM-CSF (rbGM-CSF) erhöhte die chemotaktischen und bakteriziden Fähigkeiten dieser Zellen erheblich (Reddy et al., 1990). Eine Studie von Tao et al. (1993) zeigte, dass rbGM-CSF neutrophile Granulozyten des Blutes zu einer erhöhten Superoxidproduktion anregen kann. Diese Tatsache, sowie die Verbesserung der

Chemotaxis und Phagozytose könnte die Resistenz der Milchdrüse gegenüber eindringenden Erregern erhöhen.

Gamma-Interferon (IFN- γ) ist ein Zytokin, das primär von T-Lymphozyten erzeugt wird. Es erhöht die Aktivität der natürlichen Killer-(NK)-Zellen und zytotoxischen T-Zellen, sowie die antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC). Zudem stimuliert IFN- γ Monozyten/Makrophagen zu einer verstärkten Produktion von Sauerstoffradikalen (reactive oxygen species, ROS). Hierbei spielen vor allem die Produktion von Nitrit/Nitrat sowie die Stimulierung des oxidativen Burst eine wichtige Rolle bei der direkten bakteriziden Funktion dieser Zellen (Sordillo et al., 1997). Nach Sordillo und Peel (1992) kann IFN- γ Funktionsänderungen in den phagozytischen Zellen der Milchdrüse verursachen, welche diese befähigen, den Erregern von Mastitiden wirkungsvoll entgegenzutreten. Fox et al. (1990) konnten bei intammärer Verabreichung von 10^5 Einheiten rbIFN- γ eine verbesserte Phagozytose und bakterizide Aktivität der neutrophilen Granulozyten in der Milchdrüse beobachten.

Interleukin 2 (IL-2) wird durch T-Helferlymphozyten produziert. Die Untersuchungen von Sordillo et al. (1991a) zeigen, dass Kolostrumproben, die während der letzten Wochen der Trächtigkeit gesammelt wurden, eine niedrige IL-2 Aktivität aufwiesen, was mit verminderter immunogener Zellfunktion und erhöhter Mastitisanfälligkeit während dieser Periode verbunden war. In-vitro- und In vivo-Studien zeigen ferner, dass rbIL-2 die Funktionsfähigkeit der mononukleären Zellen und die Infiltration von neutrophilen Granulozyten innerhalb der Milchdrüse erhöhen kann (Daley et al., 1991, Sordillo et al., 1991b, Torre et al., 1992). Nach Ansicht von Torre et al. (1992) führt rbIL-2 zu einer deutlich verbesserten Proliferation der aus der Milch isolierten mononukleären Zellen. Verschiedene aus der Milchdrüse isolierte Lymphozytenpopulationen zeigten in vitro nach Zusatz von IL-2 erhöhte zytotoxische und bakterizide Aktivitäten (Sordillo et al., 1991b). Bei intammärer Infusion von IL-2 konnte eine dosisabhängige Infiltration der neutrophilen Granulozyten in die Milch beobachtet werden (Daley et al., 1991, Sordillo et al., 1991b).

Die Rolle des Tumor-Nekrose-Faktors (TNF) in der Pathogenese speziell der Coli-Mastitis wurde von Sordillo und Peel (1992) untersucht. TNF gilt als Hauptmediator des endotoxischen Schocks während der perakuten Phase der Coli-Mastitis. Erhöhte Konzentrationen des TNF wurden in Serum und Milch von Kühen gefunden, die während der peripartalen Periode an akuter Coli-Mastitis verendet waren (Sordillo und Peel, 1992).

Das Komplementsystem besteht aus einer Vielzahl von Proteinen, die in Milch und Serum vorhanden sind. Neben der Mitwirkung des Komplements bei der Antigen-Antikörperreaktion (Lyse der Erreger), bei der Interferonproduktion und den

Zelloberflächenreaktionen, ist es auch im Rahmen von Entzündungsprozessen aktiv (Rolle, 1993, Reiter, 1978). Die Komplementkonzentration ist im Kolostrum, in der infizierten Milchdrüse sowie während der Trockenperiode am höchsten und während der Laktation am niedrigsten (Sordillo und Nickerson, 1988). Nach Ansicht von Reiter (1978) spielt es nur eine untergeordnete bakterizide Rolle in der Milchdrüse.

Lysozym ist ein bakterizides Protein, welches die Peptidoglykane von der Zellwand Gram-positiver Bakterien sowie die Aussenmembran von Gram-negativen Bakterien spaltet und die Bindung von Laktoferrin an die Zellwand der Bakterien verstärkt (Sordillo et al., 1997). Die antibakterielle Wirksamkeit des Lactoperoxidase-Thiocyanat-Wasserstoffperoxid-Systems hängt in starkem Masse von dem gleichzeitigen Zusammenwirken seiner drei Komponenten ab. Es besitzt eine bakteriostatische Wirkung gegen Gram-positive Bakterien, wie *St. aureus* und *Streptokokkus sp.*, und bakterizide Wirkungen gegen Gram-negative Bakterien wie coliforme Bakterien (Rolle, 1993, Outteridge und Lee, 1988). Das System zeigt eine antibakterizide Eigenschaft durch die Produktion des reaktiven Metaboliten Hypothiocyanat durch die Oxidation von Thiocyanat (Reiter, 1978). Die geringe Sauerstoffspannung im Euter ist nach Ansicht von Sordillo et al. (1997) dafür verantwortlich, dass dieser Abwehrmechanismus eine geringe Wirkung gegen euterpathogene Keime aufweist.

5.2.4.2 Faktoren der spezifischen Abwehr

Die spezifische Immunität besteht aus humoralen und zellulären Abwehrmechanismen, die durch ein kompliziertes Netzwerk verschiedener Mediatoren verbunden sind (Weir und Stewart, 1997).

Antikörper in der Milchdrüse rekrutieren sich aus den Immunglobulin-Klassen IgG₁ und IgG₂, IgA und IgM (Norcross, 1977). Den grössten Anteil der Immunglobulinfractionen machten bei Untersuchungen von Miller et al. (1988) das IgG₁ aus, gefolgt von IgM, IgG₂ und letztendlich IgA. IgA und IgM werden im Milchdrüsen-Schleimhautepithel produziert, während IgG₁ vom Serum durch selektiven Transport in die Milchdrüse aufgenommen und dann sezerniert wird.

Tabelle 11: Konzentration der Immunglobulin-Isotypen (mg/ml) der bovinen Milch in nicht infizierten und *S. aureus*-infizierten Eutervierteln, (Kasche, 1995).

Ig-Isotypen	Konzentration in boviner Milch			
	Nicht infiziert (mg/ml)	Kolostrum (mg/ml)	Nicht infiziert (mg/ml)	Infiziert (mg/ml)
IgG ₁	0.42	60	0.53	0.56
IgG ₂	0.066	2.5	0.04	0.18
IgM	0.089	6.0	0.05	0.08
IgA	0.015	4.5	0.11	0.37
	Miller et al., 1988	Sordillo et al., 1997	Doymaz et al., 1988	

Während die Konzentration der Antikörper in der Milch des gesunden Euters sehr niedrig ist (<1 mg/ml), treten hohe Konzentrationen von Immunglobulinen in der Milchdrüse bei einer Entzündung oder während der Kolostragenese auf (ca. 50 mg/ml, Norcross, 1977). Die Hauptfunktion der Immunglobuline IgG₁, IgG₂ und IgM ist die Bindung der Bakterien direkt oder mit Hilfe des C3b-Bestandteils des Komplements und deren Opsonierung. Neutrophile Granulozyten und Makrophagen können dann diese Antikörper-Bakterienkomplexe oder Antikörper-C3b-Bakterienkomplexe binden und effektiver phagozytieren. Immunglobulin A agglutiniert Mikroorganismen, verhindert die Adhärenz an die Epithelmembranen, hemmt die Vermehrung der Mikroorganismen und neutralisiert Giftstoffe (Sordillo et al., 1997).

Makrophagen spielen eine wichtige Rolle bei der zellulären Abwehr, indem sie den Lymphozyten bakterielle Antigene präsentieren und deren Immunantwort regulieren (Outteridge und Lee, 1988). Es gibt zwei Subpopulationen von Lymphozyten, die T- und B-Lymphozyten (45% bzw. 20% der Gesamtpopulation), die in der normalen Milch während der Laktationsperiode anwesend sind (Park et al., 1992). Die T-Lymphozyten können weiter in $\alpha\beta$ T-Zellen, welche CD4+ (T-Helfer)- und CD8+ (Zytotoxische und Suppressor)-Zellen enthalten, und in $\gamma\delta$ T-Zellen unterteilt werden (Park et al., 1992). Verschiedene Subpopulationen können während der Laktationsperiode in ihrer Anzahl variieren, wobei die Werte der Lymphozyten in der Milch nicht die Werte im Blut reflektieren (Wirt et al.,

1992). T-Helferlymphozyten sind für die zelluläre Abwehr verantwortlich, indem sie nach der Erkennung eines Antigen-MHC-Komplexes auf präsentierenden Zellen Zytokine produzieren (Targowski und Berman, 1975) und B-Lymphozyten zur Ausreifung, dem Ig-Isotypen-Switching, sowie der Sezernierung von Immunglobulinen anregen. Zytotoxische Lymphozyten beseitigen alte oder beschädigte sekretorische Milchdrüsenepithelzellen, deren Vorhandensein die Anfälligkeit für Infektionen erhöhen kann (Taylor et al., 1994). T-Suppressor-Lymphozyten steuern und modulieren die Immunantwort (Holly et al., 1988). Es ist bekannt, dass CD8+-Lymphozyten am Anfang der Laktation supressorischer Art sind, aber von der mittleren zur späten Laktationsperiode eine zunehmend zytotoxische Natur besitzen. Die biologische Funktion von $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten ist mit dem Schutz der Epitheloberfläche verbunden (Sordillo et al., 1997). Diese Lymphozyten zeigen eine ähnliche Aktivität wie NK-Zellen und vermitteln auch Zytotoxizität, was bedeutet, dass sie veränderte Epithelzellen zerstören können (Mackay et al., 1988). Die wichtigste Rolle der B-Lymphozyten ist die Vermehrung von Antigen-sensibilisierten Klonen und die Entwicklung von Plasmazellen, die Antikörper gegen eindringende Mikroorganismen produzieren. Sie können auch Antigene für T-Helferlymphozyten im Kontext der MHC-Class II-Moleküle präsentieren. B-Lymphozyten können durch Antigene wie Lipopolysaccharide auch direkt stimuliert werden (Weir und Stewart, 1997).

5.2.5 Verlauf von Staphylokokken- und Streptokokken-Mastitiden

In Abhängigkeit von pathogenen Faktoren des verantwortlichen Staphylokokkenstammes, seiner Anreicherung, von prädisponierenden Faktoren beim Rind und Umweltfaktoren können verschiedene Krankheitsbilder der bovinen Mastitis ausgeprägt werden (Wendt et al., 1994).

Anderson (1982) unterteilt die Staphylokokkenmastitis primär in die chronische und die seltene perakute Verlaufsform. Die perakut verlaufende phlegmonöse Mastitis tritt fast immer ante partum auf (Matsunaga et al., 1993). Die geringen Mengen des Sekrets sind serös, rötlich und mit Flocken durchsetzt. Es kommt zu einer schweren Störung des Allgemeinbefindens mit Körpertemperaturen bis zu 41°C (Wendt et al., 1994). Bei perakutem Verlauf bedingt die Toxämie oft einen letalen Ausgang. Andernfalls kann ein infiziertes Viertel vollständig nekrotisieren und sequestrieren (Vestweber und Leipold, 1993). Die Veränderungen sind in einem früheren Stadium durch eine bläuliche Verfärbung und Abkühlung des betroffenen Viertels erkennbar (Matsunaga et al., 1993).

Akute Fälle der Staphylokokkenmastitis sind durch erhebliche Entzündungssymptome und eine Störung des Allgemeinbefindens erkennbar (Jain, 1979). Die erkrankten Viertel sind

umfangsvermehrt und sehr schmerzhaft. Ein wässrig-flockiges rötliches Sekret kann ermolken werden (Wendt et al., 1994). Die somatische Zellzahl kann auf Werte bis zu mehreren Millionen je ml ansteigen (Nickerson, 1985). Heald (1979) berichtet in einer Studie über eine deutliche Milchreduktion 24 Stunden nach experimenteller intramammärer Infektion. Die tägliche Milchleistung normalisierte sich nach 6 Tagen auf das Ausgangsniveau.

Nach Vestweber (1994) zeigen ungefähr 80% der durch *St. aureus* bedingten Mastitiden einen subklinischen Verlauf. Während einer subklinischen Infektion nimmt die Zahl somatischer Zellen in der Milch im Durchschnitt auf bis zu 700.000 Zellen/ml zu (Nickerson, 1985). Es zeigte sich, dass bestimmte *St. aureus*-Stämme auch in der Milch von Kühen mit niedrigem Zellgehalt von weniger als 200.000/ml nachgewiesen werden konnten (Hoblet et al., 1988).

Ein chronischer Entzündungsprozess liegt vor, wenn die entzündlichen Veränderungen eine längere Zeit andauern. Zeitweise können feine Flocken im Anfangsgemelk auftreten (Wendt et al., 1994). Damit einhergehend können auch Atrophie und bindegewebige Induration des Euterviertels folgen. Besonders in distalen Bereichen finden sich erbsen- bis tomatengrosse Verhärtungen (Jain, 1979).

Aus der Familie der Streptococcaceae sind verschiedene Spezies für Euterentzündungen des Rindes verantwortlich. Insbesondere sind hier zu nennen *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* und *Streptococcus uberis* (Wendt et al., 1994).

Sc. uberis ist in der Regel verantwortlich für subklinische oder milde bis akute Mastitisformen während der Laktation oder Trockenstellperiode (Bramley, 1984). Thomas et al. (1994) beobachteten 24 Stunden nach experimenteller Infektion von Eutervierteln mit *Sc. uberis* Ödeme und eine Verhärtung der Milchdrüse mit einem wässrig-flockigen gelben Sekret. Nach sechs Tagen war die Milchdrüse mässig verhärtet. Die Milch war verändert und enthielt Flocken. Die Körpertemperatur war vom 2. bis 6. Tag nach der Applikation erhöht (durchschnittlich 40.8° C). Pyörälä und Mattila (1987) berichten in einer Studie über eine entzündliche Reaktion nach intramammärer Inokulation von *Sc. uberis*, *Sc. dysgalactiae* bzw. *St. aureus*. Die ersten klinischen Merkmale sowie ein Anstieg der Entzündungsparameter traten 24 Stunden nach Instillation der Erreger in Erscheinung. Bei Infektion mit *St. aureus* waren die klinischen Merkmale und die entzündliche Reaktion deutlicher ausgeprägt als bei Streptokokken. In allen Fällen prägten sich milde Mastitisverlaufsformen aus. Die Körpertemperatur nahm zu, während der Appetit unverändert blieb. Die infizierten Viertel schwellen an, in der Milch erschienen Flocken. Die Zellzahl erreichte nach 33 Stunden (12-48 Stunden) um 50 bis 90-fach höhere Werte im

Vergleich zum Ausgangsniveau. Die Zellzahlen in infizierten Vierteln kehrten nach 1-3 Wochen auf ein normales Mass zurück. Systemische und lokale Merkmale verschwanden in allen infizierten Viertel ohne Therapie, erstere innerhalb von 12 Stunden. Die Entzündungssymptome waren bei *St. aureus* am ausgeprägtesten. Die Infektion persistierte im Vergleich zu den Streptokokken-Infektionen länger.

Sc. agalactiae verursacht in der Regel chronische Verlaufsformen der Mastitis, die in 50% der Fälle innerhalb der ersten 3 Monate akut aufflackern können (Rainard und Poutrel, 1982).

5.2.6 Therapie und Prophylaxe

Obwohl verschiedentlich über Selbstheilungen bei Euterentzündungen berichtet wird und diese sich auch bei Infektionen mit *St. aureus* zwischen 20 und 47% bewegen können (Nickerson und Owens, 1993, Pankey et al., 1985), liegt es auf der Hand, dass Antibiotika im Versuch, die Ausdehnung von bakteriell bedingten Euterinfektionen zu steuern, eine wichtige Rolle spielen. Trotzdem ist der Erfolg der Therapie nicht immer gewährleistet (Nickerson und Owens, 1993). Eine Zusammenfassung der Empfindlichkeit unterschiedlicher bakterieller Stämme auf verschiedene Antibiotika findet sich in Tabelle 12. Liegen klinische Symptome vor, wird in der Praxis häufig auf einen klärenden Resistenztest verzichtet und in Abhängigkeit von der Art des wahrscheinlichen Erregers und dessen Resistenzlage ein vermeintlich bewährtes Antibiotikum ausgewählt.

Tabelle 12: Antibiotika-Gruppen und Wirkstoffe für die Mastitisbehandlung, (Wendt et al., 1994).

Antibiotikum		Empfindliche Mastitiserreger
β-Lactam-Antibiotika	Penicillin G	<i>Staphylococcus</i> sp.
	Penicillin-Procaïn	<i>Streptococcus</i> sp.
Synth. Penicillin	Cloxacillin	<i>St. aureus</i>
Cephalosporine	Cefacetril	<i>Streptococcus</i> sp.
		<i>St. aureus</i>
Aminoglycosid-Antibiotika	Neomycin	<i>Staphylococcus</i> sp.
		<i>St. aureus</i>
Tetracykline	Tetracyklin	<i>Staphylococcus</i> sp.
	Oxytetracyklin	<i>Streptococcus</i> sp., <i>E. coli</i>
Makrolid-Antibiotika	Erytromycin	<i>Staphylococcus</i> sp.
	Oleandomycin	<i>Streptococcus</i> sp.
Polypeptid-Antibiotika	Colistin	<i>Staphylococcus</i> sp.
		<i>Streptococcus</i> sp.
Andere Antibiotika	Lyncomycin	<i>Staphylococcus</i> sp.
	Tylosin	<i>Staphylococcus</i> sp.
		<i>Streptococcus</i> sp.

Während der Laktation beschränkt sich die Behandlung in den meisten Fällen auf klinisch erkrankte Tiere, kann aber auch über die Bestimmung der somatischen Zellzahl in Verbindung mit bakteriologischen Untersuchungen der Milch der einzelnen Tiere auf subklinische Erkrankungen ausgeweitet werden (Sears et al., 1990). Eberhart (1986) und Philpot (1979) stellen fest, dass der Therapieerfolg bei *St. aureus*-Mastitiden während der Trockenstellperiode zwischen 50 und 70% liegt während in der Laktation nur Werte zwischen 15 und 70% erreicht werden. Owens et al. (1991) bemerken, dass in der Laktation eine Wirksamkeit von weniger als 50% erwartet werden kann. Während der Laktation liegt die Wirksamkeit der Behandlung bei 95.6-100% gegen *Sc. agalactiae*, welcher gegenüber Penicillin hoch empfindlich ist (Wendt et al., 1994, Erskine und Eberhart, 1990), demgegenüber bei *St. aureus*, anderen Streptokokken sowie *E. coli* stark eingeschränkt (Paape et al., 1979).

Für die Therapie einer Euterentzündung stehen ausser lokaler intramammärer Behandlung auch systemische Verabreichungsformen von Antibiotika, z.B. als intramuskuläre Injektion, zur Verfügung. Damit ist eine höhere Konzentration von Antibiotika im Eutergewebe zu erreichen (Kasche, 1995). Owens et al. (1988) berichten, dass bei chronischen St. aureus-Mastitiden eine kombinierte Therapie aus maximal drei intrazisternalen Behandlungen mit Amoxicillin in 12- bis 24- stündigem Intervall, erweitert durch eine intramuskuläre Injektion von Procain-Penicillin G, wirkungsvoller ist, als die intrazisternale Applikation allein. Dies bestätigend fand Erskine (1992), dass eine kombinierte intrazisternale und intramuskuläre Therapie einen Heilungserfolg bei 51% der infizierten Viertel und 48% der Kühe aufwies, während bei alleiniger intrazisternaler Infusion der Erfolg nur bei 25% bzw. 30% lag. Gewebeanalysen zeigten in einer Studie von Owens und Nickerson (1989), dass die intramammäre Infusion nicht ausreichend hohe Konzentrationen im Parenchym bewirken konnten, um St. aureus zu eliminieren. In einer anderen Studie derselben Autoren (Owens und Nickerson, 1990) wurde sieben Kühen intramammär Penicillin G und Novobiocin appliziert. Dabei zeigte sich, dass die Antibiotika-Konzentrationen im Euterparenchym deutlich niedriger lagen als in der Milch.

Erskine und Eberhart (1990) empfehlen bei Sc. agalactiae-bedingten Bestandsproblemen eine sogenannte "Blitztherapie" aller bakteriologisch positiven Tiere nach bakteriologischer Untersuchung der Milch, weil die Kosten der ohne Kenntnis des Infektionsstatus durchgeführten Behandlung auch nicht infizierter Tiere wegen der grösseren Mengen nicht verwertbarer Milch und dem grösseren Verbrauch der Medikamente deutlich höher sind. Nach Erskine und Eberhart (1990) liess sich die Infektionsprävalenz von Sc. agalactiae bei den Kühen von 41.6% (23% der Viertel) auf 9.3% (3.4% der Viertel) nach 30 Tagen und auf 4.2% (1.6% der Viertel) ein Jahr nach der "Blitztherapie" bei gleichzeitig durchgeführten prophylaktischen Massnahmen (postdipping) reduzieren. Die Zellzahl nahm von 918.000 Zellen/ml auf 439.000 Zellen/ml nach 30 Tagen und auf 268.000 Zellen/ml nach einem Jahr ab. Weaver et al. (1986) und Yamagata et al. (1987) konnten auf diese Weise Heilungsraten von Sc. agalactiae-bedingten Mastitiden von 94% bzw. 98% der behandelten Kühe erzielen.

Die Zielsetzung einer intrazisternalen Behandlung mit Langzeit-Antibiotika während des Trockenstellens liegt in einer Elimination bestehender Infektionen zu Beginn dieses Zeitabschnitts und im Eingrenzen von Neuinfektionen speziell in der peripartalen Periode (Nickerson und Owens, 1993, Eberhart, 1986). Daneben eignet sich die Therapie mit Langzeitformulierungen zu Beginn der Trockenstellperiode sehr gut zur Behandlung chronischer Mastitiden, da nach der Behandlung und nachfolgendem Trockenstellen die wartezeitbedingten Verluste nicht zum Tragen kommen (Nickerson und Owens, 1993).

Darüber hinaus ist nach Nickerson und Owens (1993) die Effizienz der Behandlung chronischer Mastitiden zum Zeitpunkt des Trockenstellens höher als während der Laktation. Faktoren hierfür sind die höhere einsetzbare Wirkstoffkonzentration, die Regenerationsfähigkeit des Drüsengewebes während der Trockenperiode, die geringere Mastitisinzidenz während des nachfolgenden Beginns der Laktationsperiode sowie die Vermeidung potentiell nachzuweisender Medikamentenrückstände. Bis zu 40% aller Neuinfektionen des Euters treten während der ersten zwei Wochen der Trockenstellenperiode auf. Ohne antibiotische Behandlung zum Trockenstellen werden 10-15% der Viertel während dieser Periode erneut infiziert. Eine Therapie zur Trockenstellezeit ist nach Wendt et al. (1994) mit Heilungsraten von 80-89% gegen *Sc. agalactiae* sehr wirkungsvoll, wohingegen bei *St. aureus* von niedrigeren Erfolgsraten (50-80%) und bei coliformen Bakterien von sehr schlechten Heilungsraten berichtet wird (Nickerson und Owens, 1993). In einer Studie von Harmon et al. (1986) konnte eine Reduktion von Neuinfektionen in der Trockenstehphase durch die Trockenstell-Antibiotika Novobiocin, Cephapirin und Streptomycin-Penicillin (in Kombination) im Umfang von 60.5%, 74.4% bzw. 35.3% gegenüber 13.6% in einer Kontrollgruppe ermittelt werden. Bei Koagulase-negativen Staphylokokken lagen diese Werte bei 86.4%, 80,0% bzw. 100%, verglichen mit 72.7% in der Kontrollgruppe.

Einige Studien zeigten, dass die intrazisternale Verabreichung von rekombinanten bovinen Interleukin 2 (rbIL-2) die zelluläre und humorale Immunantwort in den von *St. aureus* infizierten Vierteln erhöht. Intrazisternale Infusionen von rbIL-1 β und rbIL-2 verursachten ähnliche quantitative und qualitative Veränderungen der intrazisternalen polymorphkernigen Leukozyten, wie sie bei Infektionen durch *St. aureus* gefunden wurden. Bei einer Therapie mit rbIL-2 und rbIL-1 β konnte bei 54% der Viertel (83% der Kühe) eine Heilung erzielt werden, wobei allerdings 30% dieser Viertel (50% der Kühe) Rezidive entwickelten (Daley et al., 1991). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass die Kombination von Zytokinen und Antibiotika die Wirksamkeit dieser therapeutischen Mittel verbessern kann. Eine Therapie mit Natrium-Cephapirin allein heilte durchschnittlich 32% der mit Staphylokokken infizierten Viertel, die Kombination mit rbIL-2 verbesserte die Heilungsrate um 20% bis 30%. Mit rbIL-2 alleine lag die Heilungsrate dagegen bei 20% bis 30% (Daley et al., 1992).

Während der letzten Dekade wurde die Frage der Immunisierung von Kühen zur Mastitisbekämpfung wiederholt diskutiert, und es wurden verschiedene Untersuchungen hierzu angestellt. Dabei wird erwartet, dass eine Vakzine chronische Infektionen durch Immunstimulation beseitigen, Neuinfektionen verhindern und die Frequenz und die Schwere klinischer Mastitiden verringern soll (Adlam et al., 1981). Nordhaug et al. (1994a)

stellten fest, dass eine an Färsen verabreichte Vakzine, die das Bakterin α - und β -Toxoid enthielt, einen schützenden Effekt gegen subklinische und klinische Infektionen durch *St. aureus* während der ganzen Laktationsperiode aufwies. Nach der Einschätzung von Sears et al. (1990) haben geimpfte Färsen eine grössere Fähigkeit, eingedrungene Erreger zu eliminieren, bevor ein klinisches Problem oder eine chronische Infektion entsteht. Der Einfluss verschiedener Vakzinen auf intrazisternale Infektionen durch *St. aureus* und die Antikörperproduktion bei Kühen und Färsen nach unterschiedlichen Behandlungsschemas wird in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Wirksamkeit verschiedener Vakzinen nach unterschiedlichem Behandlungsschema bei Kühen und Färsen.

Impfstoff(e)	Vakzinierungsschema	Altersgr.	Ergebnisse Versuch	Autoren
St. aureus-Exo-polysaccharid; inaktiviert; St. aureus/ Sc.sp.	BG 1: 8 und 4 Woche prep. (s.c.) BG 2: 1 und 5 Woche postp. (s.c.)	Färsen	BG.1: InInfektionsrate (St. a.): 6.7% BG.2: Infektionsrate (St.a.): 6.0% KO: Infektionsrate (St.a.) 18.8%	Giraud et al., 1997
St. aureus-Exo-polysaccharid; inaktiviert; St. aureus/ Sc. sp.	zwei mal im 4-wöchigen Intervall (s.c.)	Kühe	BG.1: Neueinfektionsrate (St. a.) 0.6% Subklinische St. a. Mastitis 10.7% BG.2: Neueinfektionsrate (St. a.) 0.5% Subklinische St. a. Mastitis 6.8%	Calzolari et al., 1997

			KO: Neueinfektionsrate (St. a.) 2.3% Subklinische St. a. Mastitis 5.9%	
inaktivierter St. aureus- Pseudokapsule α - β - Toxoid	BG: 8 und 4 Woche prep. Bereich der supra- mammären Lymphknoten KO: Placebo	Färsen	BG: Neueinfektionsrate St. a. 0% Subklinische St. a. Mastitis 8.6% Latente infektionen St. a. 37.9% KO: Neueinfektionsrate St. a. 6% Subklinische St. a. Mastitis 14% Latente infektionen St. a. 38%	Nordhaug et al., 1994a
inaktivierter St. aureus- Pseudokapsule α - β - Toxoid	Zweimal Suprama- mmären Lymphknoten	Färsen	erhöhte und anhaltende Produktion der Antikörper gegen Pseudokapsule und α -Toxin in der nachfolgenden Laktation	Nordhaug et al., 1994b

Neben der Erforschung verschiedener Impfstofftypen gilt es, den geeignetsten Zeitpunkt und Ort für die Primärimmunisierung und die Nachimpfungen zu bestimmen, deren richtige Wahl erheblich zur Effizienz und Dauer des nachfolgenden Impfschutzes beitragen (Kasche, 1995).

Die antibiotische Therapie von Euterentzündungen ist nur ein Teilaspekt eines guten Therapieprogramms. Sie allein ist nicht in der Lage, eine Mastitis zu kontrollieren,

insbesondere dann nicht, wenn andere prophylaktische Massnahmen im Umfeld der Tiere ignoriert werden (Bramley und Dodd, 1984). Es wird von verschiedener Seite eine Fülle von Hygienemassnahmen empfohlen, die sich eignen, die Rate von Neuinfektionen im Euter zu reduzieren.

Als wichtigste hygienische Massnahmen werden genannt:

- verbessertes Herdenmanagement im Bereich Haltung und Fütterung (McDonald, 1984)
- verbesserte Melkhygiene, z.B. Euterwaschung und Trocknen mit Einwegtüchern, Desinfektion der Zitzen vor und nach dem Melken (Oliver et al., 1993, Philpot, 1979, Nickerson et al., 1990)
- Einhalten einer sinnvollen Melkreihenfolge, d.h. dass infizierte Tiere zuletzt gemolken werden
- Kontrolle des Zustandes der Melktechnik
- regelmässige Reinigung und Desinfektion der Melkanlage (McDonald, 1984, Vestweber, 1994)
- Bestandserneuerung (Euterkrankte Tiere mit gesunden zu ersetzen, Schlachtung unheilbar chronisch infizierter Tiere, Philpot, 1979, Sischo et al., 1993, Nickerson, 1993a, b, Nickerson und Owens, 1993)

Bei den Zitzentauchverfahren mit desinfizierenden und pflegenden Substanzen, z.B. auf Jodbasis unterscheidet man zwischen Predipping (vor dem Melken) und dem Postdipping (nach dem Melken). Während ersteres ein Verbringen von umweltassoziierten Erregern, (Streptokokken, E. coli) die im Stall in der Zwischenmelkzeit die Zitzenhaut kontaminieren, während des Melkaktes in die Milchdrüse verhindern soll, werden durch das Postdipping Keime eliminiert, die beim Melken direkt übertragen werden können (Sc. agalactiae, St. aureus) und sich beim Umspülen der Zitze während des Melkaktes auf der Zitzenhaut ansiedeln. Nach Philpot (1979) verringert das Zitzentauchen nach dem Melken Neuinfektionen um mindestens 50%. Ergänzend hierzu wiesen Pankey et al. (1987) nach, dass ein Predip-Verfahren in Verbindung mit adaequater Eutervorbereitung die Neuinfektionsrate mit Umweltstreptokokken und E. Coli um über 50% senken kann. Eine Studie von Kingwill et al. (1970) zeigte, dass die Kombination von Postdipping und Therapie während der Trockenstellperiode die Prävalenz von Streptokokken und Staphylokokken reduzierte. Die Infektionsrate der Euterviertel wurde in einem Jahr von 29.3% auf 14.2% und in zwei Jahren auf 9.7% gesenkt. Auch Dippmittel auf der Basis von Chlorsäure und Chlordioxid, vor und nach dem Melken eingesetzt, reduzieren die

intrazisternalen Neuinfektionen um 34% im Vergleich zum alleinigen Postdipping. Hierbei wurde eine signifikante Reduzierung der Neuinfektionsrate durch *St. aureus* um 69% ermittelt (Oliver et al., 1993).

5.2.7 Probleme der Mastitistherapie

Während der Instillation von Antibiotika durch den Zitzenkanal besteht die Gefahr der Einbringung von Keimen in die Zitze und damit der Entwicklung neuer Infektionen (Soback et al., 1990). Das Einführen einer herkömmlichen Kanüle kann zu einer temporären Ausdehnung des Sphinktermuskels führen und die Keratinschicht, die den Zitzenkanal verschliesst, mechanisch geschädigt werden. Dieses kann den Eintritt von pathogenen Erregern ermöglichen und die Entstehung von Neuinfektionen begünstigen. Der Gebrauch modifizierter Kanülen, die nur partiell in den Zitzenkanal eingeführt werden, reduzierte in einer Untersuchung von Boddie et al. (1990) Neuinfektionen durch *St. aureus* um 44%. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Soback et al. (1990). Sie zeigten, dass das Einbringen der Kanüle über lediglich 2 bis 3 Millimeter die Infektionen mit *St. aureus* um 30 bis 50% senken kann.

Gründe für die teilweise geringe Empfindlichkeit von *S. aureus* gegenüber Antibiotika und damit die schlechten Therapieerfolge liegen möglicherweise in:

- einer nicht angepassten Auswahl der Antibiotika
- einer zu kurzen Behandlung (Nickerson und Owens, 1993)
- sich ausprägenden Resistenzen der Erreger gegen das Medikament (Browning et al., 1990, Brown und Scasserra, 1990, Nickerson und Owens, 1993)
- einer verzögert begonnenen Behandlung (Sandholm et al., 1990)
- der Entwicklung von bakteriellen L-Formen (Owens, 1987)
- der fehlenden Zugänglichkeit des Erregers z.B. durch Narbengewebe
- intrazellulär nicht erreichbaren oder metabolisch inaktiven Erregern (Craven und Anderson, 1979)
- der Fähigkeit der Staphylokokken, intrazellulär in bovinen peripheren polymorphonuklearen neutrophilen Granulozyten oder in Makrophagen der Milchdrüse zu überleben (Sanchez et al., 1988)
- einer schlechten Wirkstoffdiffusion durch das Gewebe
- Inaktivierungen der Antibiotika durch Milch- und Gewebeproteine, wie Kasein oder Fett (Nickerson und Owens, 1993)

- Differenzen zwischen in-vitro- und in-vivo-Wirksamkeit der Antibiotika (Vestweber, 1994)

Im Rahmen der antibiotischen Mastitistherapie können zusätzlich als spezielle Probleme der Trockenstelltherapie genannt werden:

- die Breitspektrum-Behandlung kann unter Umständen das Wachstum spezieller Erreger begünstigen (Coliforme Bakterien)
- es gibt keinen Schutz am Anfang der Laktation
- wenn die Trockenstehperiode zu kurz ist oder die Antibiotika zu spät verabreicht wurden, können am Anfang der Laktation Rückstände in der Milch nachgewiesen werden (McDonald, 1984, Nickerson und Owens, 1993)
- Resistenz der Erreger (Browning et al., 1990, Brown und Scasserra, 1990)

Sehr selten lässt sich bei *St. aureus* Stämmen bovinen Ursprungs Methicillinresistenz beobachten. Diese Form der Resistenz scheint unabhängig von einer enzymatischen Inaktivierung des Antibiotikums zu sein. Methicillin-resistente Stämme (MRSA) sind gegenüber einem weiten Spektrum von Antibiotika wie Penicillinen, Aminoglykosiden, Tetracyclinen, Makroliden, Chloramphenicol, Lincosamidinen und schweren Metallionen resistent (Witte et al., 1986). Ausser der Methicillinresistenz wird in der Literatur auch die Toleranz gegenüber β -Laktamantibiotika bei Stämmen von *St. aureus* beschrieben (Norden und Keleti, 1981). Die Antibiotikaresistenz kann sich durch spontane Änderung im Genom entwickeln oder durch Übertragung des Erbmateri als von einem Bakterium auf ein anderes verbreiten (Novick, 1981). Die Gene können direkt eine enzymatische Zerstörung und Inaktivierung des Antibiotikums bewirken (Chloramphenicol, Penicillin, Aminoglykoside), Veränderungen am Rezeptor oder dessen Umgebung verursachen (Erythromycin, Tetracyclin), oder, wie bei Sulfonamiden, blockierte bakterielle Enzyme, die für den Stoffwechsel nötig sind, durch einen anderen Stoffwechselweg ersetzen (Lacey, 1975).

Nicht zuletzt muss die falsche Anwendung von Antibiotika auch aus humanmedizinischer Sicht betrachtet werden. Neben der Frage der Kontamination von Milch durch Antibiotika (McDonald, 1984) wird die Entwicklung antibiotikaresistenter Erreger sehr stark diskutiert (Politis et al., 1991). Die Entwicklung und Ausbreitung antibiotikaresistenter Stämme kann Auswirkungen auf die Wirksamkeit der Behandlung, Kontrolle von Krankheiten und Produktivität haben. Daneben besteht durch Verbreitung antibiotischer Resistenzen die Gefahr, in Zukunft keine Therapeutika mehr gegen Infektionen des Menschen zur Verfügung zu haben (Brown und Scasserra, 1990).

6 Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund zahlreicher Berichte von klinischen und präklinischen Studien über die stimulierenden Effekte von Mistelpräparaten auf das Immunsystem, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob Iscador® M eine Wirkung auf die Immunabwehr im Euter des Rindes besitzt, damit einen möglichen Gebrauch des Präparates als Mastitistherapeutikum bewerten zu können.

Da in der Literatur keine Erfahrungen hinsichtlich der Anwendung von Mistelpräparaten bei Nutztieren zu finden waren, war das erste Ziel der vorliegenden Arbeit, die Lokalreaktion, Gewebeverträglichkeit und mögliche Nebenwirkungen des Mistelpräparates Iscador® M (Weleda, Arlesheim) bei subkutaner Verabreichung an gesunden Kühen zu evaluieren.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die immunstimulierende Wirkung von Iscador® M abhängig von der Dosierung evaluiert und gegebenenfalls eine therapeutische Dosis ermittelt und bewertet werden.

Im dritten Studienabschnitt sollte die Reaktion gegenüber Iscador® M abhängig von der Dosierung auf zellulärer sowie humoraler Ebene bei chronisch mastitiskranken Kühen analysiert werden. Ausserdem sollten zytobakteriologische Untersuchungen der Milch durchgeführt werden, um zu klären, ob Zellzahl und bakteriologische Befunde durch immunstimulierende Wirkkomponenten von Iscador® M beeinflusst werden können.

7 Verträglichkeits- und Wirkungsstudie an gesunden Kühen

7.1 Zielsetzung

Um die zelluläre Reaktivität und die klinischen Wirkungen bzw. Nebenwirkungen unter einer Iscador- Behandlung zu evaluieren, wurden die systemische und die Lokalreaktion ermittelt sowie ein Differenzialblutbild angefertigt.

7.2 Tiere, Material und Methoden

7.2.1 Versuchstiere

Die weiblichen Versuchstiere stammten von der Forschungsstation Chamau der ETH Zürich und gehören der Rasse Brown Swiss an. Die Kühe wurden in einem konventionellen Anbindestall gehalten. Sie befanden sich zum Zeitpunkt der Studie zwischen der zweiten und siebten Laktation. Ihr Körpergewicht lag zwischen 550 und 600 kg. Alle Tiere konnten nach einer klinischen Allgemeinuntersuchung als klinisch gesund eingestuft werden. Während des Versuchszeitraums wurden die Kühe mit Grassilage, Heu und einem leistungsbezogenen Kraftfutterkonzentrat gefüttert. Im Rahmen dieser Studie wurden die Kühe in zwei Gruppen aufgeteilt. Vier Kühen in der Behandlungsgruppe wurde Iscador® M subkutan in der Region des Schulterblattes appliziert. Eine Kuh wurde wegen Gesundheitsproblemen vorzeitig ausgesondert. Die vier Kühe der Kontrollgruppe blieben ohne Behandlung.

7.2.2 Versuchspräparat Iscador® M

Vom Institut Hiscia (Arlesheim, Schweiz) wurde freundlicherweise das Versuchspräparat Iscador® M zur Verfügung gestellt. Die Ampullen zu je 1 ml Injektionslösung enthielten unterschiedliche Mengen (siehe Tabelle 14) eines fermentierten, wässrigen Auszug aus *Viscum album ssp. album* (Apfelbaummistel) in physiologischer Kochsalzlösung. Im Rahmen dieser Arbeit fanden folgende Dosierungen des Präparates Verwendung (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: In Phase 1 verwendete Konzentrationen des Versuchspräparates Iscador®M.

Dosierung	fermentierter wässriger Auszug aus
0.01 mg	0.01 mg Viscum album, Planta tota
0.1 mg	0.1 mg Viscum album, Planta tota
1.0 mg	1.0 mg Viscum album, Planta tota
5 mg	5.0 mg Viscum album, Planta tota
10 mg	10 mg Viscum album, Planta tota
15 mg	15 mg Viscum album, Planta tota
20 mg	20 mg Viscum album, Planta tota

7.2.3 Verbrauchsmaterial und Laborgeräte

Es wurden zur Blutprobennahme und –versandaufbereitung folgendes Material eingesetzt:

K₂EDTA Vacutainer Röhrchen 3 ml,

Li Heparin Vacutainer Röhrchen 10 ml, (beide Beckton Dickinson),

Li Heparin Vacutainer Röhrchen 3 ml (Greiner),

Pipettenspitzen (Eppendorf),

sterile Analysengefäße 1.8 ml,

Analysengefäße 2 ml (beide Greiner),

Micro/Macropipette (Socorex),

Zentrifuge Sigma 4K 10 (Kühner)

7.2.4 Behandlungsprotokoll

Für den Versuch wurde ein für das Rind modifiziertes Behandlungsschema aus der Humanmedizin übernommen (Verein für Krebsforschung, 1996). Zehn Wochen lang wurde Iscador® M 3-mal wöchentlich, nach dem morgendlichen Melken zwischen 6.30 und 7.00 Uhr, in ansteigender Dosierung injiziert (siehe Tabelle 15). Das verabreichte Volumen änderte sich während des ganzen Versuches nicht und betrug stets 1 ml.

Tabelle 15: Behandlungs und Probensprotokol. Die Zahlen in der zweiten Spalte stehen für die Wochentage der Applikation und Blutentnahme (1=Montag, 3=Mittwoch, 4=Donnerstag, 5=Freitag).

Woche	Wochentag	Dosis	Blutprobe zur AK-Bestimmung	Blutprobe zum Differenzial-blutbild
Woche 1	1	0.01 mg	X	X
	3	0.01 mg		
	5	0.1 mg		
	7	0.1 mg		
Woche 2	1	1 mg	X	X
	3	1 mg		
	4			
Woche 3	1	5 mg		
	3	5 mg		
	5	5 mg		
Woche 4	1	5 mg	X	X
	3	5 mg		
	4	5 mg		
	5			
Woche 5	1	10 mg	X	X
	3	10 mg		
	4	10 mg		
	5			
Woche 6	1	15 mg	X	X
	3	15 mg		
	4	15 mg		
	5			
Woche 7	1	20 mg	X	X
	3	20 mg		
	4	20 mg		
	5			

Woche 8	1	20 mg		
	3	20 mg		
	4	20 mg		
	5		X	X
Woche 9	1	20 mg		
	3	20 mg		
	4	20 mg		
	5		X	X
Woche 10	1	20 mg		
	3	20 mg		
	4	20 mg		
	5		X	X

7.2.5 Blutentnahme und Blutanalysen

Blut wurde vor Behandlungsbeginn und während der Behandlungsphase einmal pro Woche, 24 Stunden nach der letzten Verabreichung einer jeweiligen Behandlungswoche (Dosisserie), aus der Vena jugularis entnommen (siehe Tabelle 15). Bei der Blutentnahme wurde ein K₂EDTA beschichtetes Vacutainersystem benützt (Becton Dickinson). Bis zur Analyse wurde das gewonnene Blut bei Raumtemperatur gelagert. In den Blutproben wurden die Gesamtleukozytenzahl und das Differentialblutbild im Veterinärmedizinischen Labor der Universität Zürich bestimmt. Leukozyten wurden mit dem automatischen Zellgerät Cell-Dyn 3500 der Firma Abbott gemessen. Die Differenzierung der Zellen erfolgte mikroskopisch. Es wurden jeweils 200 Zellen pro Blutprobe ausgezählt.

7.2.6 Messung der Körpertemperatur und Hautdicke

Zur Bestimmung der entzündlichen Lokalreaktion am Injektionsort, wie sie bei humanmedizinischen Krebspatienten beschrieben wird (Beuth et al., 1995, Overstolz, 2000, Chernyshov, 1997, Gorter et al., 1998), wurde ein Kutimeter der Firma Hauptner verwendet. Die Hautdicke und die Rektaltemperatur (Thermometer Hauptner) wurden an jedem Tag unmittelbar vor (Tagesnullwert) und 6 Stunden nach der Verabreichung von Iscador® M spezial gemessen. Die Injektionsstelle wurde vor der Messung rasiert. Die Differenz der Messwerte vor (Tagesnullwert) und 6 Stunden nach der Applikation wurde registriert und als lokale Reaktion bewertet.

7.2.7 Statistische Berechnungen

Behandlungsunterschiede in den Parametern der Blutanalysen wurden mit dem Wilcoxon-Test auf Signifikanz überprüft. Mit Hilfe der Varianzanalyse für wiederholte Messungen wurde die Signifikanz von Messwertveränderungen der Körpertemperatur während der Behandlung geprüft. Als Signifikanzgrenze galt eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%. Die Berechnungen wurden mit dem SPSS-Program (SPSS Incorporation) durchgeführt.

7.3 Ergebnisse

Die Blutzellanalysen zeigten zu keinem Behandlungszeitpunkt während der Applikationsphase einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Anzahl der neutrophilen oder eosinophilen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe, wobei sich bei allen Kühen sehr grosse intraindividuelle Unterschiede offenbarten.

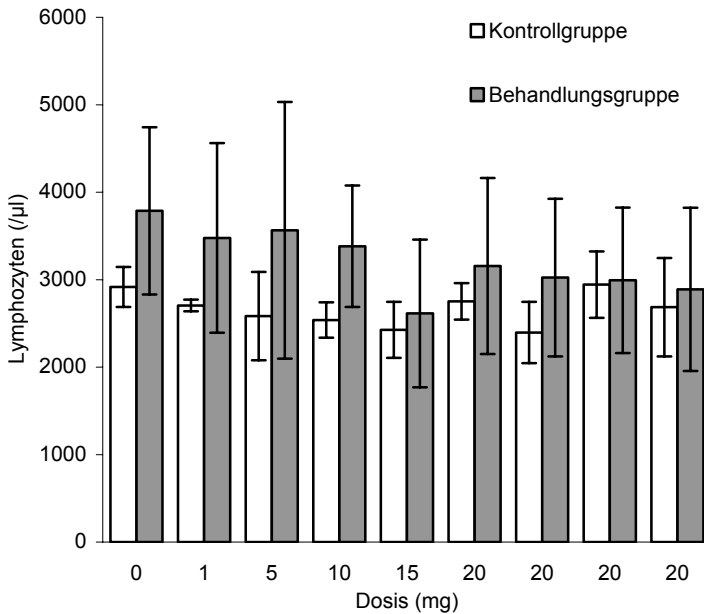


Abbildung 1: Arithmetrische Mittelwerte (\pm Standardabweichung) der Zahl der Lymphozyten pro Dosisstufe in der Kontroll- (n = 3) und Behandlungsgruppe (n = 4).

Zwischen der Kontroll- und Behandlungsgruppe liess sich schon vor dem Behandlungsbeginn in den eosinophilen Granulozyten ein statistisch signifikanter Unterschied erkennen. Die Werte verliefen in den beiden Gruppen bis zum Ende der Behandlung nahezu parallel.

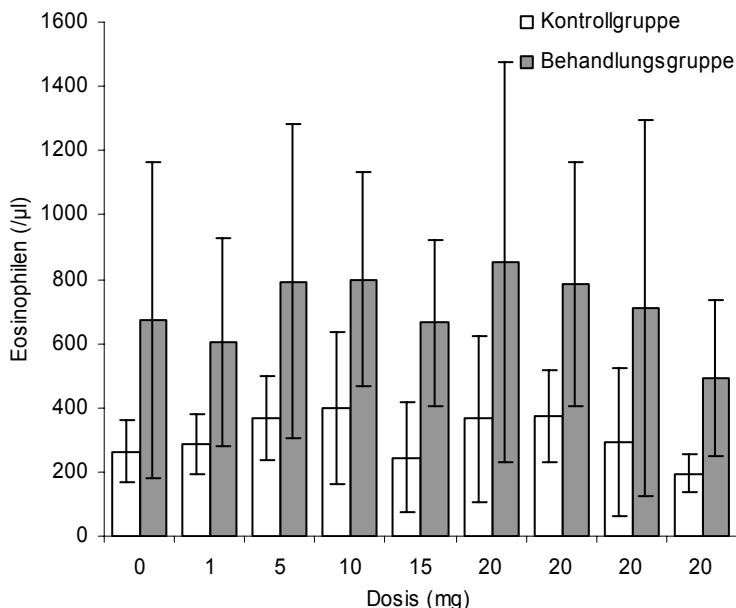


Abbildung 2: Arithmetische Mittelwerte (\pm SA) der Anzahl an eosinophilen Granulozyten pro Dosisstufe in der Kontroll- (n = 3) und Behandlungsgruppe (n = 4).

Die Körpertemperatur nach der Behandlung zeigte zu keinem Behandlungszeitpunkt eine signifikante Veränderung im Vergleich zu den vor der Behandlung gemessenen Werten. Die absolute Temperatur aller Kühe in der Behandlungsgruppe variierte über den gesamten Zeitraum zwischen 38.0°C und 38.8°C. Die Temperaturdifferenz zwischen der Messung vor und 6 (24) Stunden nach der Applikation betrug im Minimum -0.4°C (-0.5°C) und im Maximum 0.5°C (0.7°C). Der Verlauf der Temperaturdifferenzen ist Abb. 3 zu entnehmen.

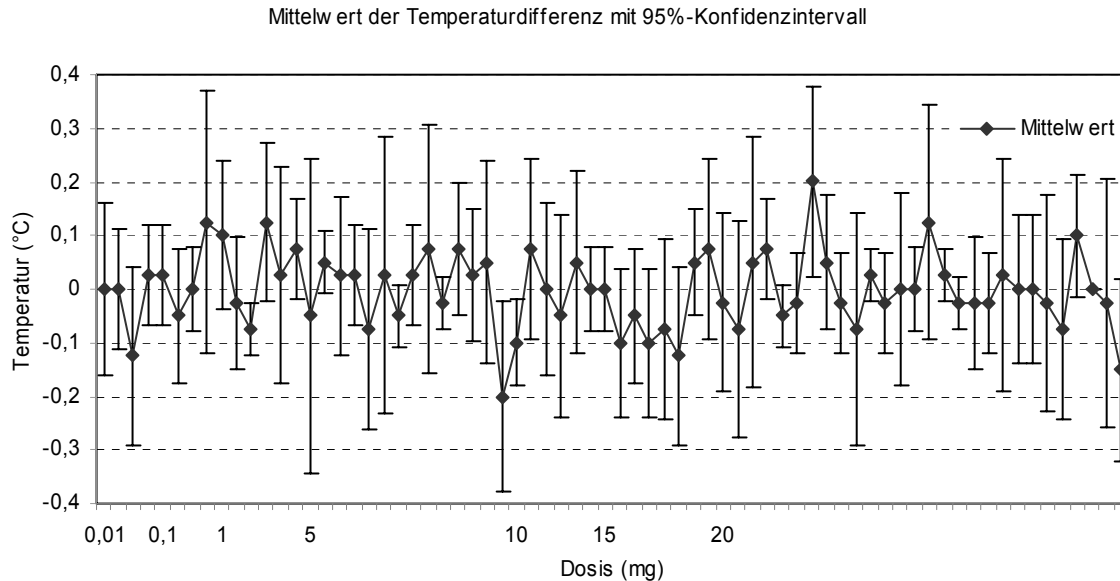


Abbildung 3: Mittelwerte der Temperaturdifferenz zwischen der Messung vor und 6 Stunden nach der Applikation aller vier Kühe der Behandlungsgruppe im Verlauf der Behandlung. Die Fehlerbalken geben den Vertrauensbereich bei einer Wahrscheinlichkeit von 95% an.

Bei allen Kühen in der Behandlungsgruppe erschien ab Verabreichung der 5 mg-Dosis an der Injektionsstelle eine lokale, unscharf begrenzte Entzündungsreaktion, die nach einigen Applikationen individuell unterschiedlich ausgeprägt war und sich im weiteren Verlauf der Behandlung ausglich. Diese Reaktion verursachte einen lokalen Juckreiz. Wegen der Verhärtung und Schwellung am Injektionsort nach mehreren Applikationen sowie der Unruhe der Tiere bei den Verabreichungen, wurde die Injektionsstelle mehrmals gewechselt und alternierend auf die contralaterale Seite verlegt. Dadurch waren die Resultate der Messungen der Hautdicke weder intra- noch interindividuell vergleichbar. Die Lokalreaktion bildete sich nach dem Wechsel der Injektionsstelle normalerweise im Verlauf von zwei Tagen zurück. Die Iscador®-Behandlung führte zu keinen weiteren, klinisch feststellbaren Nebenwirkungen. Insbesondere waren keine Auffälligkeiten bezüglich Verhalten und Aktivität der Tiere nachweisbar.

7.4 Diskussion

In diesem Studienteil sollten die Verträglichkeit und die Nebenwirkungen sowie eine eventuelle immunaktivierende Wirkung von Iscador® M bei gesunden Kühen in Abhängigkeit von der Dosierung geprüft werden. In der Humanmedizin wurden verschiedene stimulierende Effekte von Iscador® auf das Immunsystem bei Mensch und Tier beschrieben (Hajto und Lanzrein, 1986, Salzer, 1986, Hajto, 1986, Chernyshov et al., 1997, Gorter et al., 1996, Beuth et al., 1994). Die in dieser Arbeit durchgeführten Blutanalysen zeigten, dass Iscador® M im Dosisbereich zwischen 0.01 mg und 20 mg pro Kuh keinen Einfluss auf die zellulären Komponenten des Immunsystems ausübte.

Bei Human-Patienten korrelierte die Iscador®-Therapie mit einer Verbesserung der Lebensqualität und der Erscheinung anderer Nebenwirkungen (Temperaturerhöhung, etc.; siehe Kapitel 5.1.4, 5.1.5.4), was auch in dieser Arbeit beurteilt werden sollte. Eine Temperaturerhöhung bis 38°C ist in der Humanmedizin unter einer Iscador®-Therapie ein erwünschter Effekt (Overstolz, 2000) und ein relativ gutes Kriterium für das Ansprechen des Patienten auf die Misteltherapie (Wagner, 1996, Hajto, 1986). Wagner, Hajto und Hassauer et al. (1979) berichteten über eine Temperaturerhöhung bei einem Teil von Krebspatienten nach subkutaner und intravenöser Verabreichung von Iscador®. Hajto (1986) und Hajto et al., (1989, 1990) beobachtete bei Patienten eine Zunahme von Konzentration und Aktivität der NK-Zellen nach der Körpertemperaturerhöhung. Der gleiche Autor erwähnt, dass die erhöhte Temperatur von Veränderungen auf zellulärer Ebene begleitet wurde und als Indikator für die Zunahme von TNF und IL-6 angesehen wurde. Gleichzeitig mit der Temperaturerhöhung kann bei den Patienten an der Injektionsstelle auch eine entzündliche Reaktion auftreten (Beuth et al., 1995, Overstolz, 2000, Chernyshov et al., 1997, Stoss et al., 1999, Lukyanova et al., 1994, Gorter et al., 1998). Die Lokalreaktion bei den Patienten vermittelt ein Bild der Reaktionslage des Gesamtorganismus auf die Misteltherapie und wird zur individuellen Dosisfindung herangezogen (Overstolz, 2000). In der Literatur gibt es keine Angaben zu Nebenwirkungen von Iscador® bei Nutztieren. Beuth et al. (1994) konnten bei Mäusen im Dosisbereich von 0.5, 1.0, 2.5 und 5.0 ng/kg KG ML-1 keine Nebenwirkungen bezüglich Fressverhalten, Gewicht, Fellbeschaffenheit und körperlicher Aktivität nachweisen.

Auch bei den Kühen in der vorliegenden Studie traten ausser einer entzündlichen Lokalreaktion, die einen Juckreiz verursachte, keine weiteren, klinisch feststellbaren Nebenwirkungen auf. Eine lokale Reaktion mit Juckreiz wurde auch bei den Patienten in

der Humanmedizin beobachtet (Overstolz, 2000, Stein, 1995). Ein Zusammenhang zwischen der Lokal- und Immunreaktion konnte in der vorliegenden Studie nicht hergestellt werden. Wie schon am Anfang der Diskussion beschrieben, beeinflusste Iscador® bei gesunden Tieren die zellulären Komponenten des Immunsystems nicht. Es wäre von Interesse, in weiteren Untersuchungen mit höheren Dosierungen den Zusammenhang zwischen der lokalen Reaktion und den verschiedenen zellulären und humoralen Immunparametern zu erforschen. Ein Grund für das Fehlen von immunstimulierenden Effekten und Nebenwirkungen von Iscador® bei den Tieren lag möglicherweise darin, dass zu niedrige Dosen injiziert wurden. Die höchste im vorliegenden Versuch injizierte Dosis betrug 20 mg Iscador® M. Dies entspricht 0.033 – 0.036 mg/kg Körpergewicht fermentierten Auszug aus *Viscum album*. Im Vergleich dazu werden in der Humanmedizin bei Patienten während einer Therapie deutlich höhere Dosen an Iscador® M verabreicht. Hajto und Lanzrein (1986) verwendeten Dosierungen von 0.36 mg/kg KG (bezogen auf frische *Viscum album* Extrakte) bei Krebspatienten. Die Untersuchungen von Kovacs et al. (1991) wurden mit Dosierungen von 0.33 mg/kg KG (bezogen auf frische *Viscum album* Extrakte) bei intravenöser Verabreichung durchgeführt. Kjaer (1988) schliesslich setzte Dosen von 20, 30 und 50 mg/Patient bei subkutaner Verabreichung ein.

Andererseits stellt sich die Frage, ob die Ergebnisse der humanmedizinischen Studien unmittelbar auf andere Spezies übertragbar sind. Ausserdem ist man bei der Evaluation der Nebenwirkungen bei Tieren im Vergleich zum Menschen nur auf sichtbare und messbare Zeichen begrenzt. Schliesslich muss in Rechnung gestellt werden, dass es sich bei den Probanden dieses Versuches um gesunde Tiere handelte. Inwieweit sich das zelluläre Reaktionsmuster zwischen krebskranken Humanpatienten und gesunden Kühen ohne Behandlung bzw. nach einer immunmodulierenden Therapie unterscheidet, muss offenbleiben. Sicher werden sich hierbei wesentliche Unterschiede ergeben.

8 Wirkungs- und Dosisfindungsstudie an gesunden Kühen

8.1 Zielsetzung

Der zweite Studienabschnitt wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob bei Applikation einer höheren Dosis von Iscador® M eine Wirkung auf zellulärer als auch auf humoraler Ebene auftritt und gegebenenfalls eine therapeutische Dosis zu ermitteln.

8.2 Tiere, Material und Methoden

8.2.1 Versuchstiere

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden 13 Kühe der Rasse Brown Swiss und zwei Kühe der Rasse Holstein Friesian aus der gleichen Herde der Forschungsstation Chamau der ETH Zürich in die Studie aufgenommen. Die Bedingungen bezüglich Fütterung und Aufstallung sowie das Herdenmanagement waren identisch mit denen der ersten Studie (Kapitel 7.2.1). Die Kühe wurden vor und während des Versuches als klinisch gesund befunden und kamen vor dem Versuch nicht mit Iscador® in Kontakt.

8.2.2 Versuchspräparat Iscador® M

Grundlegende Daten zum Iscador® M wurde schon im Kapitel 7.2.2 beschrieben. In dieser Versuchsphase unterschieden sich die eingesetzten Dosierungen im Vergleich zum ersten Abschnitt wie in Tabelle 16 angegeben. Aufgrund der fehlenden Reaktionen auf zellulärer Ebene in der ersten Versuchsphase wurden in diesem Abschnitt die Dosen höher veranschlagt (s.u.).

8.2.3 Verbrauchsmaterial und Laborgeräte

Es wurden zur Blutprobennahme und –versandaufbereitung folgendes Material eingesetzt:

K₂EDTA Vacutainer Röhrchen 3 ml,

Li Heparin Vacutainer Röhrchen 10 ml, (beide Beckton Dickinson),

Li Heparin Vacutainer Röhrchen 3 ml (Greiner),

Pipettenspitzen (Eppendorf),

sterile Analysengefäße 1.8 ml,

Analysengefäße 2 ml (beide Greiner),

Micro/Macropipette (Socorex),
Zentrifuge Sigma 4K 10 (Kühner)

8.2.4 Behandlungsprotokoll

Die Tiere wurden nach dem Zufallsprinzip in zwei Gruppen geteilt. Den 9 Kühen in der Behandlungsgruppe wurde Iscador® dreimal wöchentlich (jeweils am Montag, Mittwoch und Donnerstag) subkutan injiziert (siehe Tabelle 16). Wegen der fehlenden Reaktion auf zellulärer Ebene nach dem folgenden Behandlungsschema wurde versuchsweise in der fünften Behandlungswoche 15 mg Iscador® M täglich verabreicht. Den anderen 6 Kühen wurde das gleiche Volumen physiologischer Kochsalzlösung nach dem gleichen Behandlungsschema verabreicht. Da sich die verschiedenen immunologischen Parameter in der Kontrollgruppe als über 5 Wochen stabil erwiesen, wurde die Behandlung in dieser Gruppe nach 36 Tagen abgebrochen, da die Behandlungen und Probennahmen für den Betrieb eine erhebliche Belastung darstellten und mit keiner Änderung der Messwerte über diesen Tag hinaus zu rechnen war. Die Kühe in der Behandlungsgruppe wurden nach dreiwöchiger Pause in einem zweiten Behandlungszyklus mit höheren Dosen weiter behandelt (Tabelle 16).

Tabelle 16: Behandlungs- und Probenprotokoll. Die Zahlen in der zweiten Spalte stehen für die Wochentage der Applikation und Blutentnahme (1:Mo.,...,7:So.).

Erster Behandlungszyklus				
Dauer	Wochentag	Dosis	Blutprobe zur AK-Bestimmung	Blutprobe zum Differenzialblutbild
Woche 1	1		X	X
	1	1 mg		
	3	1 mg		
	4	1 mg		
	5		X	X
Woche 2	1	5 mg		
	3	5 mg		
	4	5 mg		
	5		X	X
Woche 3	1	10 mg		
	3	10 mg		
	4	10 mg		
	5		X	X
Woche 4	1	15 mg		
	3	15 mg		
	4	15 mg		
	5		X	X
Woche 5	1	15 mg		
	2	15 mg		
	3	15 mg		
	4	15 mg		
	5	15 mg		
	6	15 mg		

	7	15 mg		
Woche 6	1	Pause	X	X
Woche 7	Pause			
Woche 8	Pause			
Zweiter Behandlungszyklus				
Woche 9	1	25 mg	X	X
	3	25 mg		
	4	25 mg		
	5		X	X
Woche 10	1	25 mg		
	3	25 mg		
	4	25 mg		
	5		X	X
Woche 11	1	50 mg		
	3	50 mg		
	4	50 mg		
	5		X	X
Woche 12	1	75 mg		
	3	75 mg		
	4	75 mg		
	5		X	X
Woche 13	1	100 mg		
	3	100 mg		
	4	100 mg		
	5		X	X

8.2.5 Blutentnahme und Blutanalysen

Blut wurde vor Behandlungsbeginn und einmal pro Woche, 24 Stunden nach der letzten Verabreichung von Iscador® M in einer Behandlungswoche (Dosisserie) aus der Vena jugularis entnommen (siehe Tabelle 16). Die Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl und des Differentialblutbildes wurde schon im Kapitel 7.2.5 beschrieben und erfolgte in dieser Versuchsphase analog. Für die Bestimmung der gegen das ML-1 gerichteten Antikörper wurde ein Lithium-Heparin beschichtetes Vacutainersystem gebraucht. Die Blutproben wurden 15 Minuten bei 4°C und 1378 x g zentrifugiert. Die obere Plasmaschicht wurde in die Analysengefäße abpipettiert und bis zu den Analysen bei –20°C eingefroren. Die Analysen wurden im Labor des Forschungsinstituts Hiscia durchgeführt.

8.2.5.1 ELISA-Verfahren zur Bestimmung von anti-ML-1 Antikörpern

Das Prinzip eines "enzyme-linked-immunosorbent-assay" (ELISA) besteht darin, zunächst ein Antigen an eine feste Oberfläche zu binden und daran die zu untersuchenden Antikörper zu koppeln (Engvall, 1980). Deren Nachweis erfolgt mit Hilfe eines weiteren Antikörpers, an den ein Enzym fest gebunden ist. Dieses ist in der Lage, ein Substrat in ein Chromogen umzuwandeln, das photometrisch gemessen werden kann.

Die Vertiefungen von Immunoassay-Mikrotitrationsplatten wurden mit 110 µl der in Carbonatpuffer (0.05 Mol/l, pH 9.6) gelösten monoklonalen Antikörper (2.5 µg) SIFIN AntiML-A-5H8 adsorptiv beladen.

In die Reihe 1 der anschliessend gewaschenen und mit 100 µl einer in PBS-Tween 20 auf 2000 µg/ml verdünnten gereinigten ML-1-Probe pipettiert, die nach serieller Verdünnung in 100 µl-Schritten (von 1-12) geschüttelt inkubiert wurde (30 min/35°C). Nach dem Waschen (5mal mit PBS-Tween) wurde in jede Vertiefung der Reihe A 100 µl einer 1:50 Verdünnung (in PBS-Tween-10% FCS) eines Kontrollserums, das keine Antikörper gegen die Mistellektine 1-3 enthielt, pipettiert. Die Reihen B bis H erhielten in gleicher Weise 100 µl einer 1:50 verdünnten Patientenserumprobe.

Nach einer geschüttelten Inkubation (30 min/35°C) mit anschliessendem Waschen (5mal mit PBS-Tw) wurden in alle Vertiefungen der Platte 100 µl des in PBS-Tw (1:5000) verdünnten markierten, monoklonalen anti-IgG-Antikörper SIFIN AntiML-A-5F5 (AC-2) pipettiert. Der sich anschliessende Inkubations- und Waschvorgang war mit den vorangegangenen identisch. Nach Inkubation und Waschen erfolgte die Entwicklung der festphasengehenden Enzymaktivität mit einer gebrauchsfertigen Lösung von

Tetramethylbenzidin (100 µl/Vertiefung) unter Schütteln (15 min/RT). Die photometrische Auswertung bei 450 nm nach Abstoppen der Reaktion mit 100 µl 0.5 N Schwefelsäure führte zu den Konzentrations-Extinktionsbeziehungen. Die Bewertung ergibt die Konkurrenz der Bindung des ML-spezifischen mAk SIFIN AntiML-A-5F5 an ML-1 durch ML-spezifische Immunglobuline. Grenzwert zwischen der spezifischen und unspezifischen Reaktion wurde nicht festgelegt.

8.2.5.2 Ammoniumchloridlysemethode zur Gewinnung von Blutleukozyten

Diese Methode nutzt die unterschiedliche Empfindlichkeit von Erythrozyten und Leukozyten gegenüber einer hypotonen Pufferlösung aus. Während die Erythrozyten bei der angegebenen Inkubationszeit bereits lysiert werden, schwellen die Leukozyten nur leicht an und können mittels nachfolgender Zentrifugation gewonnen werden.

Die Ausbeute lag zwischen 1 und 2.6×10^6 Zellen je ml Blut.

Die Pufferlösung des Lysepuffers setzt sich wie folgt zusammen:

8.29g Ammoniumchlorid

1g Kaliumhydrogencarbonat

0.37g Dinatrium Ethylendiamintetraacetat (2 H₂O-EDTA)

in 1l ddH₂O lösen und mit 1M NaOH pH von 7.2 einstellen

durch 0.45µm Filter sterilfiltrieren oder 15min bei 1bar 121°C autoklavieren

Das Analyseprotokoll sieht folgendermassen aus:

1. Blutentnahme in silikonisierte Glasflaschen mit 1/5 3.8%iger Natriumcitratlösung (w/v)
2. Je 10 ml des Blut / NaCitrat-Gemisches in 50 ml-Reagenzröhrchen, mit 40 ml Ammoniumchloridlysepuffer vermischen, 10 min bei RT inkubieren
3. 250xg 10 min 4°C zentrifugieren, Überstand absaugen
4. Leukozytenpellet dreimal mit PBSa (phosphate buffered saline) bei 250xg 8 min 4°C waschen
5. Zellen in PBSa resuspendieren, Zellzahl mit Trypanblaufärbung (s.u.) bestimmen bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis lagern

8.2.5.3 Histopaque Methode zur Gewinnung von mononukleären Zellen

Bei dieser Methode werden zur Trennung die unterschiedlichen Dichteigenschaften der verschiedenen Blutzellpopulationen genutzt. Das verwendete Histopaque 1083® (Sigma) ist eine polysaccharosehaltige Lösung mit einer Dichte von 1,083g/ml. Das Prinzip der

Trennung beruht darauf, dass bei Zentrifugation die Erythrozyten an der Grenzfläche zum Trennmedium unter der Wirkung des Histopaque aggregieren. Dadurch erhöht sich ihre Sedimentationsgeschwindigkeit, so dass sie sich am Boden des Zentrifugenröhrchens sammeln. Die Leukozyten bilden keine solchen Aggregate. Während die Dichte der Granulozyten ausreicht, um durch das Trennmedium hindurch zu sedimentieren, sammeln sich Lymphozyten und Monozyten zusammen mit den Thrombozyten an der Grenzfläche zum Histopaque. Dort bilden sie eine deutlich weisse Schicht, die zur weiteren Verarbeitung abpipettiert und danach analysiert werden kann.

Die Ausbeute lag zwischen 0.7 und 3.6×10^6 mononukleären Zellen / ml Blut. Das erwachsene Rind hat etwa $2.5 - 5.5 \times 10^6$ mononukleäre Zellen / ml Vollblut.

Folgendes Analyseprotoll kam bei dieser Methode zur Anwendung:

1. Blutentnahme in Lithium-Heparin beschichtete Vacutainer
2. je 15 ml Blut in einem 50 ml-Reagenzröhrchen mit 15 ml PBSa mischen und vorsichtig mit 15 ml raumtemperiertem Histopaque 1083[®] unterschichten
3. bei 1200xg 30 min RT zentrifugieren (*wichtig: Bremsfunktion der Zentrifuge ausschalten, da sich sonst die Phasen wieder mischen können*)
4. zellreiche weisse Interphase in ein neues Röhrchen überführen
5. 3x in 4°C kaltem PBSa waschen (200xg 8 min 4°C)
6. Zellen in PBSa resuspendieren und Zellzahl (Trypanblaumethode s.u.) bestimmen
7. bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis lagern

Stimulation von mononukleären Leukozyten mit Iscador[®]

Das als Lyophylisat vorliegende Iscador[®] M - bzw. Placebochargen wurden entsprechend den Angaben des Herstellers in Lymphozytenkulturmedium gelöst (1 ml Medium) und in Abhängigkeit von dem jeweiligen Versuch auf die gewünschte Verdünnungsstufe eingestellt. Die Gebrauchslösungen wurden anschließend zu 2×10^5 PBMC (peripheral blood mononuclear cells) pro Vertiefung einer Rundbodenmikrotiterplatten gegeben (Endvolumen: 200 µl Vertiefung) und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde entweder die Proliferation der PBMC über einen 18-stündigen [³H]-Thymidineinbau bestimmt oder es wurden für den Nachweis verschiedener Zytokine die Zellkulturüberstände gewonnen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C

gelagert. Für alle Stimulationsversuche wurden nur frisch gelöste Chargen von Iscador® M eingesetzt.

Polyklonale Aktivierung von mononukleären Leukozyten mit ConA

Für eine polyklonale Aktivierung von PBMC mit dem Pflanzenlektin Concanavalin-A (ConA) wurden 2×10^5 PBMC/Mikrokultur in einem Gesamtvolumen von 200 µl Lymphozytenkulturmedium/Mikrokultur unter Zugabe von 10 µg/ml ConA in Rundbodenmikrotiterplatten stimuliert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde die Proliferation der PBMC über einen 18-stündigen [^3H]-Thymidineinbau ermittelt. Die Zellen wurden anschliessend auf Glasfasermatten geerntet, und die eingebaute Menge des [^3H]-Thymidins wurde mittels Flüssigkeitsszintillation in einem beta-counter (Becton Dickinson FACScan) gemessen.

Formalinfixierung von Zellen

Im Gegensatz zu der Situation nach γ -Bestrahlung sind Zellen nach einer Formalinfixierung nicht mehr stoffwechselaktiv. Vielmehr werden die Zellen in ihrem ursprünglichen Zustand und ihrer Struktur "konserviert". Dies ist in Versuchen, bei denen eine Antigenaufnahme verhindert werden soll, von Bedeutung. Für die Formalinfixierung wurden PBMC mit Lymphozytenkulturmedium auf eine Konzentration von 5×10^4 /ml eingestellt und eine äquivalente Menge einer 10%igen formalinhaltigen Lösung (Cell-FixTM, Becton Dickinson, 1:10 in PBS verdünnt) wurde zugegeben. Nach einer siebenminütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Zellen dreimal mit jeweils 10 ml Lymphozytenkulturmedium gewaschen, um überschüssiges Formalin zu entfernen.

8.2.5.4 Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf bestimmten physikalischen Eigenschaften von einzelnen Zellen oder anderen kleinen Partikeln. Die Zellen passieren in einem Flüssigkeitsstrom einzeln einen Laserstrahl. Jede Zelle bricht bzw. streut einen Teil des Strahles und fluoresziert selbst nach Anregung durch den Laser aufgrund ihrer Grösse oder Granularität. Detektoren des Zytometers messen verschiedene Parameter: die Intensität der 'Vorwärts-Streustrahlung' (forward scatter intensity), die parallel (180°) zum Laserstrahl gemessen wird, ist annähernd proportional zum Zelldurchmesser. Je stärker die Zelle den Strahl nach vorne - d.h. in Richtung des Laserstrahles - streut, desto grösser ist ihre Oberfläche. Die 'seitliche Streuung' (side scatter intensity) - gemessen in einem Winkel von 90° zum Laserstrahl - gibt eine Information über die Granularität der Zelle.

Ausserdem können Fluoreszenzintensitäten bei verschiedenen Wellenlängen gemessen werden. Dies wird bei der Färbung der Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern ausgenutzt. Zellen können so auf das Vorkommen und die Dichte bestimmter Oberflächenantigene hin untersucht werden.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden Zellen mittels indirekter Einzelfärbungen untersucht. Die Primärantikörper gegen die bovinen Oberflächenantigene CD11b, CD14 und CD32 wurden in Mäusen produziert und sind vom Typ IgG₁. Der Antikörper gegen bovines MHC Klasse II ist ein IgG_{2a} Isotyp.

Als sekundäre Antikörper wurden FITC-markierte isotypenspezifische monoklonale (mAKs) verwendet. Die Isotypenkontrolle zeigt, wieviel des gemessenen Fluoreszenzsignales auf unspezifische Antikörperbindung zurückzuführen ist. In dieser Arbeit diente für die Messungen von CD11b, CD14 und CD32 FITC-markiertes Maus-IgG₁ als Isotypenkontrolle, das gegen ein irrelevantes Epitop eines *Aspergillus niger*-Enzyms gerichtet ist. Als Isotypenkontrolle für die MHC Klasse II-Messungen wurde ein gegen das galline CD4-Molekül gerichteter Antikörper verwendet. Eine spezifische Bindung dieser Antikörper kann ausgeschlossen werden.

Isolierte PBMC wurden in PBS, mit 1% (w/v) BSA und 0.1% (w/v) Natriumazid (NaN₃) resuspendiert. Die Herstellung der Lösung erfolgte in der Weise, dass zunächst eine 10%ige Natriumazidlösung in PBSa angefertigt und bei 4°C aufbewahrt wurde. Dazu wurden 5g BSA in 495ml PBSa bei 37°C gelöst und 5ml einer 10%igen NaN₃-Lösung dazugeben.

Die Färbung erfolgte nach folgendem Protokoll:

1. Zellen 2x in PBSa waschen (250xg 8 min 4°C)
2. mit PBS/BSA/NaN₃ auf eine Konzentration von etwa 1x10⁶ Zellen/ml einstellen und 50 µl pro Probe in eine 96-Lochplatte pipettieren (da mit NaN₃ gearbeitet wird, können alle folgenden Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt werden, zur Schonung der Zellen wurde trotzdem gekühlter Puffer verwendet und bei 4°C zentrifugiert)
3. 25 µl 1. Antikörper bzw. Isotypenkontrolle hinzufügen und 10 min bei Raumtemperatur inkubieren
4. 3x mit PBS/BSA/ NaN₃ bei 250xg 2 min 4°C waschen, nach jedem Waschschritt Zellen kurz im Plattenschüttler lösen
5. Isotypenkontrollen (direkte Färbung) in PBSa resuspendieren und bei 4°C im Dunkeln aufbewahren

6. 25 µl 2. Antikörper hinzufügen, 10 min bei RT inkubieren
7. 3x mit PBS/BSA/ NaN₃ bei 250xg 2 min 4°C waschen
8. Proben in PBS oder PBS mit 0.5% Formaldehyd resuspendieren und bis zur Messung bei 4°C im Dunkeln aufbewahren

Messungen

Die Durchflusszytometriemessungen wurden im Institut für Nutztierwissenschaften der ETH-Zürich auf einem FACScan Analyzer (Becton Dickinson, Basel, CH) durchgeführt. Die Emission wurde mit einem 525nm Bandpass-Filter gemessen. Forward und side scatter intensity wurden linear, die Fluoreszenzen logarithmisch gemessen. Zur Datenanalyse wurde die Shareware WinMDI 2.5[®] (Joe Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, Kalifornien) verwendet.

8.2.6 Statistische Berechnungen

Um bei den Untersuchungen verschiedener Blutzellen eventuelle Unterschiede zwischen beiden Gruppen festzustellen, wurde im ersten Behandlungszyklus der t-Test (zweiseitige Fragestellung) angewendet. Da der zweite Behandlungszyklus nur mit der Behandlungsgruppe durchgeführt wurde, wurde die Signifikanz von Messwertveränderungen verschiedener Blutzellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit der Varianzanalyse für wiederholte Messungen geprüft. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Antikörper gegenüber ML-1 wurde mit dem Wilcoxon-Test überprüft. Die Berechnungen wurden mit dem SPSS-Program (SPSS Incorporation) durchgeführt.

8.3 Ergebnisse

Das Plasma der unbehandelten und behandelten Kühe wurde mit Hilfe des ELISA-Verfahrens auf Antikörper gegenüber ML-1 untersucht. Die Resultate sind in der Tabelle 17 (a,b) vorgestellt. Bestimmt wurden Antikörper vom IgG-Typ. Bei den Analysen der Antikörpertiter konnte festgestellt werden, dass mit einer Ausnahme alle Kühe bereits vor der Iscador® M-Behandlung Antikörper vom IgG-Typ ausgebildet hatten. Diese lagen bei maximal 9 Lektin-bindenden Einheiten (LBE). Während die Werte der IgG bei allen Kühen in der Kontrollgruppe (KO) bis zum Ende des ersten Behandlungszyklus konstant niedrig blieben, zeigte sich bei den Kühen in der Behandlungsgruppe (BG) schon nach der Serie von 10 mg eine statistisch signifikante Zunahme. Vergleicht man die Werte der LBE in Abhängigkeit von der applizierten Dosis, so wird deutlich, dass im hohen Dosisbereich behandelte Kühe die höchsten Antikörpertiter aufweisen.

Tabelle 17 (a,b): Verlauf der anti-ML-1 Antikörper (IgG) im Verlauf der Behandlung in der Behandlungs- (BG, a) und Kontrollgruppe (KO, b) in Lektin-bindende Einheiten (LBE).

a) BG	Vor Beh	1. BW 1 mg	2. BW 5 mg	3. BW 10 mg	4. BW 15 mg	5. BW 15 mg	Pause
Kuh 7	7	6	30	56	75	87	49
Kuh 8	8	11	22	39	60	144	67
Kuh 9	5	8	22	11	25	32	21
Kuh 10	3	6	13	27	46	93	22
Kuh 11	5	11	13	19	41	43	62
Kuh 12	7	11	13	77	117	132	14
Kuh 13	4	9	13	25	34	43	41
Kuh 14	3	5	6	7	11	22	23
Kuh 15	8	8	18	75	58	160	43

a) BG	6. BW 25 mg	7. BW 50 mg	8. BW 75 mg
Kuh 7	58	232	310
Kuh 8	132	413	538
Kuh 9	17	53	55
Kuh 10	23	46	59
Kuh 11	81	437	327
Kuh 12	16	85	128
Kuh 13	38	308	301
Kuh 14	17	75	66
Kuh 15	43	241	226

b) KO	Vor Beh.	1. BW 1 mg	2. BW. 5 mg	3. BW 10 mg	4. BW 15 mg	5. BW 15 mg
Kuh 1	4	8	12	7	8	10
Kuh 2	6	8	7	8	7	13
Kuh 3	4	7		7	5	5
Kuh 4	9	11	16	14	8	13
Kuh 5	0	0	25	4	8	5
Kuh 6	6	10	26	14	8	12

Um einen Überblick über den relativen Anstieg der Antikörper bei den einzelnen Kühen während der Behandlung zu erhalten, wurde bei allen Kühen der Quotient aus dem AK-Titer der jeweiligen Behandlungswoche und dem Nullwert als Mittelwert des AK-Titers vor Behandlungsbeginn und dem nach der ersten Behandlungswoche mit 1 mg Extrakt als Nullwertfaktor (NWF) ermittelt. Die Resultate sind in Tabelle 18 (a,b) dargestellt. Obwohl alle Kühe in der Behandlungsgruppe während der Behandlung mit einem Anstieg der AK-Titer reagierten, verlief die Reaktion bezüglich Art und Umfang zwischen den einzelnen Kühen unterschiedlich.

Aufgrund ihres Reaktionsmusters konnten drei verschiedene Reaktionsklassen identifiziert werden. Während eine Kuh (Nr. 9) auf die erhöhten Dosen mit einem maximalen NWF von 8.2 nach der 50 mg-Dosierung sehr schwach reagierte (Einteilung in Gruppe 0, RG0), zeigten bei fünf anderen Kühen (Nrs. 7, 8, 11, 13, 15) die Antikörpertiter nach der Dosisserie von 50 mg eine rasche Steigerung der NWF von 30 bis 55 (RG2), die bei zwei Kühen bis zum Ende der Behandlung bestehen blieb. Die drei Kühe (Nrs. 10, 12, 14) in der

RG1 reagierten zwar stärker als die Kühe in der RG0, erreichten aber nur in einem Fall nach dem ersten Behandlungszyklus einen knapp über 20 liegenden NWF und in keinem Fall nach dem zweiten Behandlungszyklus einen NWF in dieser höchsten Kategorie. In der Kontrollgruppe zeigten die Kühe während der Behandlung keine Reaktion. Bei allen Kühen in der Kontrollgruppe blieb der NWF unter 10.

Tabelle 18 (a,b): Relativer Verlauf der anti-ML-1 Antikörpern (IgG) in Nullwertfaktoren (NWF). BL (Baselinenwert): Mittelwert aus den ersten beiden Werten (0 und 1 mg), RG (Reaktionsgruppe).

a) BG	BL	RG	2. BW. 5 mg	3. BW 10 mg	4. BW 15 mg	5. BW 15 mg	Pau-se
Kuh 7	6.5	2	4.6	8.6	11.5	13.4	7.5
Kuh 8	9.5	2	2.3	4.1	6.3	15.2	7.1
Kuh 9	6.5	0	3.4	1.7	3.8	4.9	3.2
Kuh 10	4.5	1	2.9	6.0	10.2	20.7	4.9
Kuh 11	8.0	2	1.6	2.4	5.1	5.4	7.8
Kuh 12	9.0	1	1.4	8.6	13.0	14.7	1.6
Kuh 13	6.5	2	2.0	3.8	5.2	6.6	6.3
Kuh 14	4.0	1	1.5	1.8	2.8	5.5	5.8
Kuh 15	8.0	2	2.3	9.4	7.3	20.0	5.4

a) BG	6. BW 25 mg	7. BW 50 mg	8. BW 75 mg
Kuh 7	8.9	35.7	47.7
Kuh 8	13.9	43.5	56.6
Kuh 9	2.6	8.2	8.5
Kuh 10	5.1	10.2	13.1
Kuh 11	10.1	54.6	40.9
Kuh 12	1.8	9.4	14.2
Kuh 13	5.8	47.4	46.3
Kuh 14	4.3	18.8	16.5
Kuh 15	5.4	30.1	28.3

b) KO	BL	G	2. BW. 5 mg	3. BW 10 mg	4. BW 15 mg	5. BW 15 mg
Kuh 1	6.0	0	2.0	1.2	1.3	1.7
Kuh 2	7.0	0	1.0	1.1	1.0	1.9
Kuh 3	4.5	0	0.0	1.3	0.9	0.9
Kuh 4	10.0	0	1.6	1.4	0.8	1.3
Kuh 5	0					
Kuh 6	8.0	0	3.3	1.8	1.0	1.5

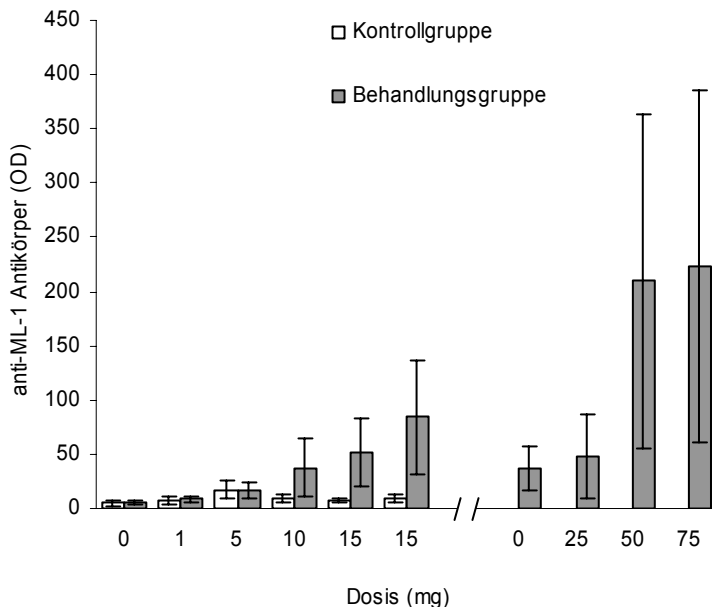


Abbildung 4: Arithmetische Mittelwerte der anti-ML-1 Antikörper (IgG, \pm SA) in der Kontroll- (n=5) und Behandlungsgruppe (n=9) abhängig von der applizierten Dosis.

Um den Einfluss der verschiedenen Dosierungen von Iscador[®]M auf zelluläre Immunreaktionen abschätzen zu können, wurden bei den Kühen in der Kontroll- und Behandlungsgruppe auch verschiedene Blutzellfraktionen bestimmt. Zwischen der Kontroll- und Behandlungsgruppe liess sich schon vor dem Behandlungsbeginn in der Lymphozytenzahl ein statistisch signifikanter Unterschied erkennen (siehe Abb. 5). Im weiteren Verlauf der Behandlung verliefen die Werte in den beiden Gruppen nahezu parallel. Im zweiten Behandlungszyklus nahmen die Werte in der Behandlungsgruppe nach der Serie von 50 mg signifikant zu. Bei einer Kuh (Nr. 14) liessen sich bezüglich der Lymphozyten sowie der Monozytenzahl und der Anzahl neutrophiler Granulozyten keine Veränderungen im Verlauf der Behandlung erkennen.

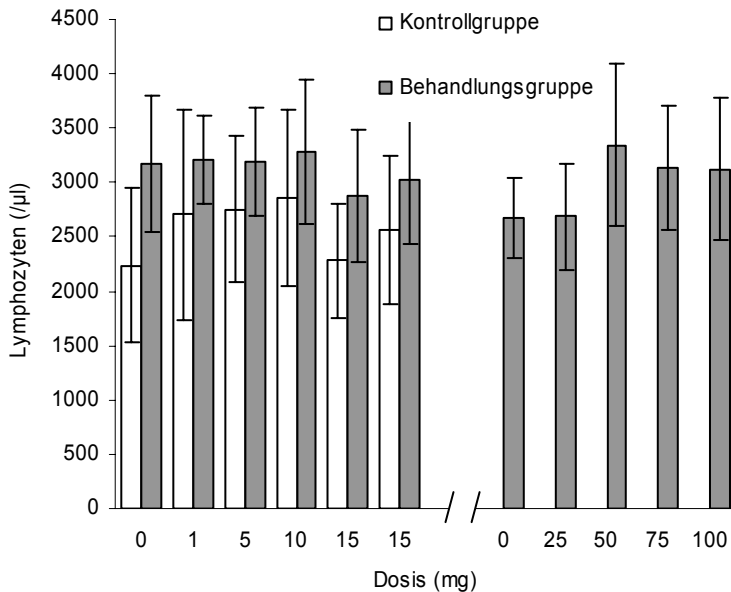


Abbildung 5: Arithmetische Mittelwerte der Lymphozyten (\pm SA) pro Dosisstufe in der Kontroll- (n=5) und in der Behandlungsgruppe (n=9).

Bei den Analysen der anderen Blutzellen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und Behandlungsgruppe nachgewiesen werden. Im zweiten Behandlungszyklus stiegen die Konzentrationen der eosinophilen Granulozyten bei allen Kühen in der Behandlungsgruppe bis zum Ende der Behandlung an. Der Unterschied zwischen dem Mittelwert vor und während der Behandlung war statistisch signifikant. Im zweiten Behandlungszyklus konnte in der Behandlungsgruppe nach der Dosisserie von 25 mg und 50 mg bei den Werten der Monozyten eine statistisch signifikante Zunahme beobachtet werden. Zum Ende der Behandlung sinken die Werte wieder signifikant ab.

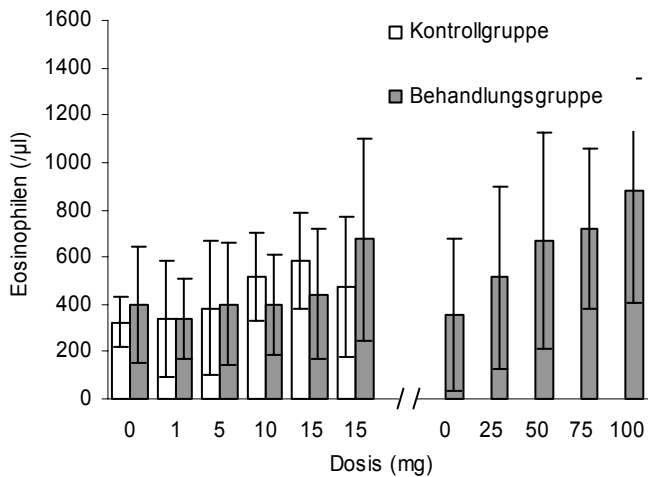


Abbildung 6: Arithmetische Mittelwerte der eosinophilen Granulozyten (\pm SA) pro Dosisstufe in der Kontroll- (n=5) und Behandlungsgruppe (n=9).

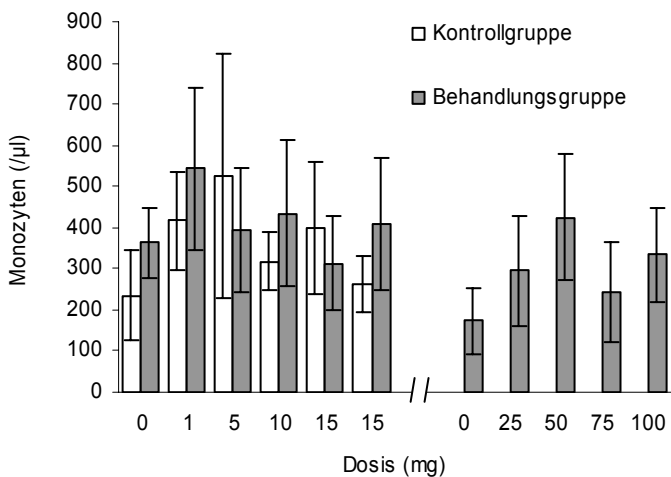


Abbildung 7: Arithmetische Mittelwerte der Monozyten (\pm SA) pro Dosisstufe in der Kontroll- (n=5) und Behandlungsgruppe (n=9).

Der Vergleich zwischen der zellulären (Lymphozytenzahl) und der humoralen Immunantwort (IgG) lässt den Schluss zu, dass die Reaktion gegenüber Iscador® M in erster Linie humoraler Art war. In keinem Fall konnte eine Korrelation zwischen der Lymphozytenzahl und der Antikörperproduktion in Abhängigkeit von der Dosierung nachgewiesen werden.

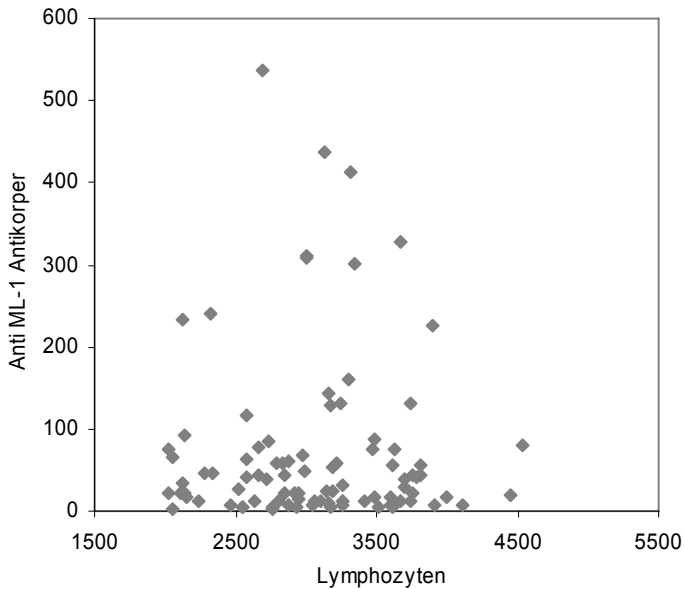


Abbildung 8: Vergleich zwischen den Lymphozyten und den anti ML-1 Antikörpern (IgG) bei den Kühen unter der Iscador®-Behandlung ohne Berücksichtigung der Dosierung.

Die PBMC der drei behandelten Kühe, wurden nach der durchgeführten Behandlung in vitro auf die Reaktivität gegenüber Concanavalin A (ConA) als Postivkontrolle sowie auf Iscador® M untersucht. Im Vergleich zu den hohen Stimulationswerten der PBMC gegenüber ConA konnte bei Iscador® M keine Stimulation der PBMC nachgewiesen werden.

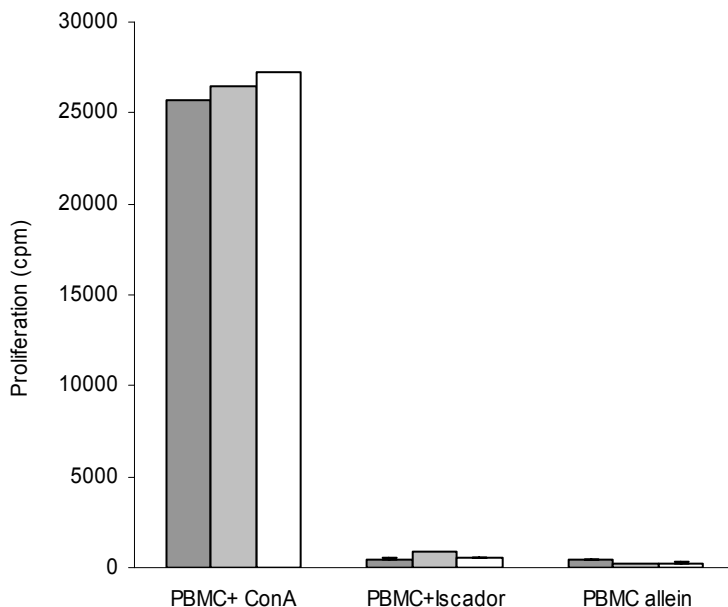


Abbildung 9: Darstellung der PBMC-Proliferationswerten behandelter Kühe (n=3) nach Zusatz von ConA, Iscador® und spontaner Proliferation. Angegeben sind die cpm (counts per minute).

Iscador® M wurde von den Tieren, soweit klinisch zu ermitteln war, gut vertragen und neben einer lokalen Entzündungsreaktion, die sich nach dem Wechsel der Injektionsstelle nach zwei Tagen zurückbildete, wurden keine anderen unerwünschte Nebenwirkungen festgestellt.

8.4 Diskussion

In der Literatur finden sich sehr viele Angaben zur immunstimulierenden sowie -modulierenden Wirkung von Mistelextrakten. Die Wirkung wird für sehr komplex gehalten, wobei die vermutliche Interaktion mehrerer Substanzen wie Lektine, Viscotoxine und Oligo- sowie Polysaccharide die Darstellung des Wirkmechanismus erschwert (Leroi, 1981).

Die zu den Lektinen gehörenden Mistellektine sind Glykoproteine, die spezifische Bindungsstellen für bestimmte Kohlenhydrate aufweisen. Ausser aus Pflanzen wurden Lektine auch aus Bakterien, Pilzen, Flechten und Tieren sowie im Menschen isoliert (Raven, 1988, Barondes, 1981). Ashwell und Marell (1974) entdeckten auf Zellmembranen von Säugetierorganen membrangebundene Lektine. Heute sind auch von fast allen menschlichen Organen Lektine bekannt. Makrophagen und verschiedene Lymphozytenpopulationen haben Lektine auf ihrer Zelloberfläche, über die sie (je nach Spezifität) mit anderen Zellen in Kontakt treten können (Luther und Becker, 1986). Manche Lektine (ConA) führen bei Lymphozyten in vitro zu einer Stimulation und stellen Mitogene dar, andere wirken entweder toxisch (Ricin) oder üben keinen Effekt aus (Lektine aus der Erdnuss, Licastro et al., 1983). Mistellektine sind die in ihrer Struktur und Wirkungsweise am besten untersuchten Inhaltsstoffe der Mistel. Bisher wurden 3 Mistellektine mit unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften isoliert, die als Mistellektin I, II und III bezeichnet werden (Franz, 1986).

In der Literatur wurde eine statistisch signifikant gesteigerte Lymphozytenzahl, Monozytenzahl und -aktivität in vivo bei Mäusen nach subkutaner Verabreichung von ML-1 beschrieben (Beuth et al., 1994). Beuth et al. (1992) berichten ferner über eine Zunahme der gesamten T- und T-Helferzellen und über geringere Effekte bei den B- und T-Suppressor-Zellen nach Applikation von ML-1 bei Tumorpatienten. Ein stimulierender Einfluss auf die Makrophagen von Tieren und Menschen wurde von Ribéreau-Gayon et al. (1996) und Hajto et al. (1990) ermittelt.

Polysaccharide stellen eine weitere Gruppe in der Natur weit verbreiteter Substanzen dar, von denen einige die Eigenschaft haben, die Zellen des natürlichen Immunsystems zu stimulieren (Jordan und Wagner, 1986). Das gilt auch für Oligo- und Polysaccharide der Mistel, die in erster Linie einen Einfluss auf die NK-Zellen, die Zytokinsekretion (Klett und Anderer, 1989) und die Phagozytose-Aktivität der Makrophagen und neutrophilen Granulozyten haben (Jordan und Wagner, 1986).

Derartige Studien wurden im Wesentlichen bei Krebspatienten und an Versuchstieren durchgeführt. Angaben für die Untersuchungen der zellulären und humoralen Immunparameter bei anderen Tieren unter Iscador®-Behandlung wurden in der Literatur nicht gefunden. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit untersucht werden, wie sich die zellulären und humoralen Immunparameter bei gesunden Kühen unter einer Iscador®-Behandlung im Vergleich zu einer Kontrollgruppe verhalten.

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass eine Kultivierung der PBMC unter Zusatz von Iscador® M, im Gegensatz zu einer Stimulation mit ConA, zu keiner erhöhten Proliferation der Zellen führte. Analoge Beobachtungen wurden schon von Stein und Berg (1996) sowie Stein (1995) beschrieben. Im Gegensatz zum Iscador® P (Kiefern-mistel-Extrakt), der verhältnismässig mehr Mistellektin im Vergleich zu Viscotoxin erhält, konnte Iscador® M sowie ML-1 keine Proliferation der PBMC induzieren. Bei der Proliferation durch Iscador® P wurden Monozyten und T-Helferzellen am meisten aktiviert. Die Autoren folgern daraus, dass für die Proliferation der PBMC ML-1 keine Rolle spielt. Da Iscador® M im vorliegenden Versuch ebenfalls keinen Einfluss auf die Lymphozytenproliferation ausübte, kann es sich bei Mistellektin auch nicht um eine mitogene Substanz handeln. Dies wurde schon von Stein (1995) beobachtet.

Die Stimulation verschiedener Zelltypen in vivo durch verschiedene Mistelextrakte wurde von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben. So beschreibt Salzer (1986) eine erhöhte Zahl der eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten nach intrapleuraler Instillation sowie eine Zunahme der eosinophilen Granulozyten nach subkutaner Verabreichung von Mistelextrakten (Stein, 1995). Hajto (1986) fand nach intravenöser Applikation von Iscador® eine Erhöhung der neutrophilen Granulozyten. In der vorliegenden Arbeit konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und Behandlungsgruppe bei den Blutzellen im ersten Behandlungszyklus nachgewiesen werden. Die Mehrheit der Kühe reagierte im zweiten Behandlungszyklus nach der Serie von 50 mg Iscador® M mit einer Zunahme der Lymphozyten und Monozyten. Auch die Werte der eosinophilen Granulozyten zeigten bei allen Kühen im Verlauf der Behandlung eine Erhöhung. Da der zweite Behandlungszyklus ohne Kontrollgruppe durchgeführt wurde, lässt sich nur spekulieren, ob die Zunahme der Blutzellen eine Reaktion gegenüber Iscador® M war. Analysiert man die Reaktion innerhalb der Behandlungsgruppe, so zeigten sich auch grosse Unterschiede in der Reaktion zwischen den einzelnen Kühen. Auffällig in der vorliegenden Studie war, dass eine Kuh nicht oder sehr schlecht auf der zellulären sowie humoralen Ebene auf die Iscador® M-Behandlung reagierte, was schon bei Probanden in der Humanmedizin beschrieben wurde (Stein, 1995). Aufgrund der bisherigen

Erfahrungen in unserer Arbeit sowie auch der Angaben aus der Humanmedizin über das individuelle Verhalten der verschiedenen Immunparameter (Stein, 1995, Stettin et al., 1990) lässt sich vermuten, dass es in Bezug auf die Misteltherapie für jeden Patient eine individuell optimale Dosis herauszufinden gilt.

Neben der zellulären Immunität wurde auch die humorale Reaktion gegenüber Iscador® M untersucht. Bei allen unbehandelten Kühen konnten niedrige Antikörpertiter vom IgG-Typ nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe führte die Behandlung mit höheren Dosen von Iscador® M in der Behandlungsgruppe zu einer signifikanten Zunahme der anti-ML-1 Antikörper (IgG). Die Geschwindigkeit und das Ausmass der Antikörperproduktion auf die Antigenexposition war individuell unterschiedlich. Es scheint, dass der Antikörpertiter von der Dosis und von individuellen Faktoren abhängig ist, was schon in der Humanmedizin von Stettin (1992) und Stein (1995) beschrieben wurde. Der Vergleich der zellulären (Lymphozyten) und humoralen Reaktion gegenüber Iscador® M zeigte, dass die Reaktion gegenüber Iscador® M in erster Linie humoraler Art war. Das Phänomen konnte schon Stein (1995) in der Humanmedizin bei Patienten beobachten.

Als eine optimale immunstimulierende Dosis von ML-1 wurde bei Tieren sowie bei humanmedizinischen Patienten 1 bis 1.5 ng/kg KG (Beuth et al., 1993, 1994, 1995, Wagner, 1996, Chernyshov et al., 1997, Stein, 1995, Kovacs et al., 1991) beschrieben. Beuth et al. fanden bei Mäusen auch im niedrigen Dosisbereich (0.5 ng/kg KG) eine relevante immunstimulierende Wirkung. Die Methodik der Lektinbestimmung wurde inzwischen verbessert. Dabei stellte sich heraus, dass Iscador®-Dosen mit wesentlich höherem Lektingehalt (4 ng/kg KG) bei einzelnen Patienten eine Immunstimulation auslösen können, obwohl von solchen Dosen früher eine Suppression erwartet worden wäre (Verein für Krebsforschung, 1996). Im Vergleich zu den Präparaten mit definiertem Gehalt an ML-1 ist Iscador® M wie erwähnt auf den Extraktgehalt aus frischer *Viscum album* definiert. Der Gehalt der ML-1 ist aber damit nicht klar definiert. Unterschiedliche Substanzkonzentrationen sind z.B. allein schon durch unterschiedliche Erntezeitpunkte gegeben (Gabijs et al., 1994). Nach Jordan und Wagner (1986) enthält Iscador® M gar kein ML-1. Kovacs et al. (1991) fand 5 ppm ML-1 in Iscador® M bezogen auf frische *Viscum Album*. Nach der Meinung von Leroi (1981) wird die Iscador® Wirkung für sehr komplex gehalten, wobei eine Interaktion mehrerer Substanzen wie Lektine, Viscotoxine und Alkaloide vorliegt. In der Literatur lassen sich nur wenige und unterschiedliche Angaben hinsichtlich der Dosierungen von Iscador® M finden. Hajto und Lanzrein (1986) konnten nach der intravenösen Applikation von 0.36 mg/kg KG und Kovacs et al. (1991) nach der intravenösen Applikation von 0.33 mg/kg KG (Bezogen auf Gesamtextrakt von

Viscum album) bei Krebspatienten eine Immunstimulation nachweisen. Ebenso beobachtete Hajto (1986) bei Krebspatienten mit Dosen zwischen 0.21 und 0.38 mg/kg KG Iscador® M nach intravenöser Applikation eine immunstimulierende Wirkung. Seine Dosierung stützt sich auf die Abschätzung des LD₅₀-Wertes bei Mäusen von Reed und Münch (1938), welcher mit 168 mg/kg (bezogen auf Gesamtextrakt von Viscum album) angegeben ist. Kjaer (1988) applizierte bei Tumorpatienten Dosen von 20, 30 und 50 mg/Patient und konnte keine Veränderungen bezüglich der Überlebenszeit nachweisen. Nach Rentea et al. (1981) wurden bei drei verschiedenen Mäuse- und Rattenstämmen nach intraperitonealer Verabreichung von Iscador® M Werte zwischen 348 und 700 mg für die LD₅₀ gefunden. Die therapeutische Dosis stützt sich auf eine Abschätzung von Wolff (1970), welcher berichtet, dass die therapeutische Dosis für Iscador® M im Bereich von 5 bis 15% der letalen Dosis (LD₅₀) liegt.

Da in der vorliegenden Studie keine Analysen hinsichtlich der Menge von ML-1 in den applizierten Iscador® M-Präparaten durchgeführt wurden, müssen sich die Schätzungen auf die Informationen des Herstellers über die Menge des Mistelextraktes stützen. Im Versuch wurden Dosen von 1 bis 100 mg Iscador® M eingesetzt, was bei einer 550 - 600 kg schweren Kuh dem Dosisbereich von 0.0018 (0.0016) – 0.18 (0.16) mg/kg KG des fermentierten, wässrigen Auszugs aus Viscum album entspricht. Vergleicht man die Dosen in der vorliegenden Arbeit mit den in den Studien von Hajto (1986), Hajto und Lanzrein (1986) sowie Kovacs et al. (1991) applizierten Dosen, ist nicht auszuschliessen, dass die Dosen zu gering waren, um eine zelluläre Immunreaktion zu verursachen. Hinsichtlich dieser Studien hätte in der vorliegenden Untersuchung eine optimale immunstimulierende Dosis zwischen (115.5) 126 und (209) 228 mg/Kuh liegen müssen. Dabei ist aber anzumerken, dass in der vorliegenden Arbeit die Beurteilung der immunologischen Reaktion und damit die Dosierung sich insbesondere an der Ausbildung der ML-1-spezifischen Antikörper orientierte und nicht an den Veränderungen klinischer Art, die methodisch ohnehin nicht erfassbar waren, oder an der Reaktion auf zellulärer Ebene. Aufgrund von Studien aus der Humanmedizin sind die eingesetzten Präparate insbesondere in ihren Stoffkonzentrationen und Mengen-Verhältnissen der Inhaltsstoffe nicht miteinander vergleichbar und die Aufklärung des Wirkungsmechanismus der Mistelextrakte setzt eine genauere Standardisierung der Extrakte voraus. Aufgrund der Angaben in der Humanmedizin über das individuelle Verhalten der verschiedenen Immunparameter bei den Patienten stellt sich auch die Frage, ob die Ergebnisse, welche bei Patienten in der Humanmedizin und bei Versuchstieren beschrieben sind, auf andere Tierarten übertragbar sind. Franz et al. (1981) konnten z.B. nachweisen, dass alle drei

Lektine im gleichen Titer in der Lage sind, humane Erythrozyten zu agglutinieren, während sich bei Tieren wesentliche Unterschiede zeigten, speziell bei den Wiederkäuern. So führten bei Kühen ML-2 und ML-3 zu keiner Agglutination.

9 Wirkungs- und Dosisfindungsstudie bei Kühen mit chronischer Mastitis

9.1 Zielsetzung

Im dritten Studienabschnitt sollte die Reaktion gegenüber Iscador® M in Abhängigkeit von der Dosierung auf zellulärer sowie humoraler Ebene bei chronisch mastitiskranken Kühen analysiert werden.

Die Bestimmung des Gehaltes der verschiedenen Blutzellen vor und nach der Behandlung mit Iscador® diente dazu, herauszufinden, ob es zu einer Proliferation der Blutzellen kommt und wenn ja, welche Zellen daran beteiligt sind. FACS-Analysen sollten zur Klärung der Frage nach den proliferierenden Zellsubpopulationen in der Milch und im Blut unter einer Iscador® M-Behandlung beitragen. In einem weiteren Schritt sollte der Einfluss des Mistelpräparates Iscador® M auf die Phagozytoseaktivität der Monozyten untersucht werden. Ferner sollte die Bildung der anti-ML-1 Antikörper bei den chronisch mastitiskranken Kühen evaluiert werden. Schliesslich wurden zytobakteriologische Untersuchungen der Milch durchgeführt, um zu klären, ob Zellzahl und bakteriologische Befunde durch Iscador® M beeinflusst werden.

9.2 Tiere, Material und Methoden

9.2.1 Versuchstiere

Für die vorliegende Studie wurden 20 Milchkühe, die sich zwischen der zweiten und der fünften Laktation befanden und zwischen 600 und 650 kg schwer waren, auf einem privaten Milcherzeugerbetrieb im Kanton Aargau eingestallt. Die Tiere gehörten den Rassen Brown Swiss (8 Kühe), Deutsche Schwarzbunte (3 Kühe) und Rotbunte (9 Kühe) an. Es handelte sich hierbei ausschliesslich um Kühe, die auf mindestens einem Euterviertel unter einer chronischen Mastitis litten. Um in den Versuch aufgenommen zu werden, mussten die Kühe auf mindestens einem Viertel eine Zellzahl von über 250.000/ml und einen mindestens einmalig positiven bakteriologischen Befund mit euterpathogenen Keimen (*St. aureus*, *Streptococcus* spp.) aufweisen. Die Kühe durften ferner keine Zitzenverletzungen, insuffiziente Strichkanäle oder andere Zitzenalterationen aufweisen. Die letzte Antibiotikabehandlung sollte gegebenenfalls länger als einen Monat zurückliegen. Bis auf zwei Kühe hatten die Tiere zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns keine über die Mastitis hinausgehenden Gesundheitsprobleme. Eine Kuh wurde wegen

Problemen mit den Beinen vorzeitig ausgesondert. Eine weitere wies Euterwarzen auf, die grosse Probleme beim Melken verursachten und somit vermutlich einen Einfluss auf die Zellzahl hatten. Diese Kuh wurde jedoch nicht aus der Studie genommen.

Die Kühe wurden während des Versuches in einem konventionellen Anbindestall gehalten. Sie wurden mit Heu, leistungsbezogenem Kraftfutter und Grassilage gefüttert. Es standen darüber hinaus Weideflächen für die Tiere zur Verfügung. Die Kühe wurden zweimal täglich zur gleichen Zeit mit einer Eimermelkanlage gemolken.

9.2.2 Iscador® M

Es wurde in diesem Versuchsabschnitt das gleiche Mistelpräparat (Iscador® M) wie im Kapitel 7.2.2 beschrieben mit unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt.

9.2.3 Behandlungsprotokoll

Nach einer Akklimationsphase von zwei Wochen erfolgte die Behandlung. Zehn Kühen in der Behandlungsgruppe (BG) wurde Iscador® in ansteigender Dosierung nach dem morgendlichen Melken subkutan im Bereich des Schulterblattes injiziert. Wegen der zu erwartenden lokalen Reaktion bei hohen Dosierungen wurden Dosen über 25 mg mit 20 ml physiologischer Kochsalzlösung verdünnt injiziert. Den anderen 10 Kühen in der Kontrollgruppe (KO) wurde das gleiche Volumen physiologischer Kochsalzlösung verabreicht (siehe Tabelle 19).

Tabelle 19: Behandlungs- und Probenprotokoll. Die Zahlen in der zweiten Spalte stehen für die Wochentage der Applikation und Blutentnahme (1:Mo.,...,7:So.).

Dauer	Wochen Tag	Dosis	Blutproben zur AK- Bestimmung	Blutproben zur Blutzelldifferenzie- rung (DIFF) und FACS-Analysen	Milchproben zur Zellzahl (ZZ) und FACS- Analysen
1 Woche	Akklimatisation				
2 Woche					
3 Woche	1		X	DIFF, FACS	ZZ, FACS
	1	1 mg			
	3	5 mg			
	4		X	DIFF	ZZ
4 Woche	1	10 mg			
	2	25 mg			
	3	50 mg			
	4		X	DIFF	ZZ
5 Woche	1	50 mg			
	2	75 mg			
	3	75 mg			
	5	75 mg			
	6		X	DIFF	ZZ
6 Woche	1	75 mg			
	3	75 mg			
	5	75 mg			
	6		X	DIFF, FACS	ZZ, FACS
7 Woche	1	100 mg			
	3	100 mg			
	5	100 mg			

	6		X	DIFF	ZZ
8 Woche	1	100 mg			
	3	100 mg			
	5	100 mg			
	6		X	DIFF	ZZ
9 Woche	1	100 mg			
	3	100 mg			
	5	150 mg			
10 Woche	1	150 mg			
	3	150 mg			
	4		X	DIFF, FACS	ZZ, FACS

9.2.4 Verbrauchsmaterial

Zur Blutprobengewinnung und –aufbereitung wurde folgendes Material verwendet:

Spritzen, 2 ml, 10 ml, 20 ml (Beckton Dickinson),

K₂EDTA Vacutainer Röhrchen 3 ml Li Heparin Vacutainer Röhrchen 10 ml, (beide Beckton Dickinson),

Li Heparin Vacutainer Röhrchen 3 ml (Greiner),

Pippettenspitzen (eppendorf),

sterile Analysengefäße 1.8 ml,

Analysengefäße 2 ml (beide Greiner),

sterile Zentrifugenrörschen 15 ml (Falcon),

sterile Zentrifugenrörschen 50 ml (Greiner),

Vacutainernadeln (Beckton Dickinson)

9.2.5 Blutentnahme und Blutanalysen

Zu 8 verschiedenen Zeitpunkten wurde Blut (siehe Tabelle 19) aus der Vena Jugularis entnommen: einmal 24 Stunden vor der Behandlung und 7-mal während der Behandlung (wöchentlich jeweils 24 Stunden nach der letzten Applikation, Ausnahme Woche 9). Für die Probennahme zur Blutzelldifferenzierung wurde ein K₂EDTA beschichtetes Vacutainersystem gebraucht. Bis zu den Analysen wurde das gewonnene Blut bei Raumtemperatur ungefähr 1 Stunde gelagert. Die Blutanalysen wurden im hämatologischen Labor Medica in Zürich durchgeführt. Leukozyten wurden mit dem automatischen Zellgerät ADVIA 120 der Firma Bayer gemessen. Die Differenzierung der Zellen erfolgte mikroskopisch. Es wurden mindestens 100 Zellen pro Objektträger ausgezählt.

Für die Blutprobennahme zur Bestimmung der gegen das ML-1 gerichteten Antikörper und der Zellsubpopulationen (FACS-Analysen) wurde ein mit Lithium-Heparin beschichtetes Vacutainersystem eingesetzt. Die Blutproben für die Antikörperbestimmung wurden 15 Minuten bei 4°C (3000 rpm) zentrifugiert. Die obere Plasmaschicht wurde dann in die Analysengefäße abpipettiert und für die Analysen bei -20° C eingefroren.

Da nicht bei allen Kühen gleichzeitig FACS-Analysen durchgeführt werden konnten, wurden nur 6 Blutproben pro Gruppe an 3 verschiedenen Testpunkten untersucht. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde das gewonnene Blut bei 4°C gelagert.

9.2.5.1 ELISA-Verfahren zur Bestimmung von Antikörpern

Das hier Verwendung findende ELISA-Verfahren wurde bereits im Kapitel 8.2.5.1 eingehend beschrieben.

9.2.5.2 Durchflusszytometrische Untersuchungen des peripheren Blutes

Die Gewinnung von Leukozyten und mononukleären Zellen aus dem Blut, das Prinzip der Durchflusszytometrie, die Messung und Datenanalyse wurden schon im Kapitel 8.2.5.2, 8.2.5.3 und 8.2.5.4 beschrieben.

9.2.6 Milchentnahme und -analysen

Die Viertelgemelksproben wurden von jeder Kuh zu verschiedenen Zeitpunkten für die zyto-bakteriologischen Analysen genommen: 24 Stunden vor Behandlungsbeginn und 7-mal (einmal pro Woche) während der Behandlung (siehe Tabelle 19). Die Milchproben

wurden vor dem morgendlichen Melken nach trockener Reinigung und anschliessender Desinfektion der Zitzen unter Verwerfung der ersten drei Strahlen gezogen.

9.2.6.1 Gewinnung von Leukozyten aus der Milch

1. Milchentname in 50 ml-Zentrifugenrörschen (Falcon)
2. Je 15 ml Milch mit 30 ml PBSa/20 ml EDTA mischen
3. 600xg 30 min 10°C zentrifugieren, Überstand absaugen
4. Leukozytenpellet zweimal in 50 ml PBSAa bei 300xg, 8 min, 4°C waschen
5. Zellzahl bestimmen (10^6 ml^{-1})
6. Separation von Leukozyten
7. Nach dem Waschen (Schritt 4) Zellen in 30 ml PBSa resuspendieren
8. mit 15 ml Histopaque 1.083[®] unterschichten
9. bei 1200xg 30 min RT zentrifugieren
10. zellreiche weisse Interphase in ein neues Röhrchen überführen
11. 1x in 50 ml PBSa waschen (600xg 10 min 4°C)
12. 2x in 50 ml PBSa waschen (300xg 8 min 4°C)
13. Zellzahl bestimmen (10^6 ml^{-1})

9.2.6.2 Durchflussszytometrie

Das Prinzip der Durchflussszytometrie wird gleich wie bei Blut und wurde schon im Kapitel 8.2.5.4 beschrieben.

9.2.7 Statistische Berechnungen

Um bei den Blut- und Milchuntersuchungen eventuelle Unterschiede zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe festzustellen, wurde der t-Test angewendet. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Antikörper gegenüber ML-1 wurde mit dem Wilcoxon-Test überprüft. Die Berechnungen wurden mit dem SPSS-Program (SPSS Incorporation) durchgeführt.

9.3 Ergebnisse

Blutanalysen

Das Blutplasma aller Kühe wurde mit Hilfe des ELISAs auf anti-ML-1 (IgG) Antikörper untersucht. Dabei fiel auf, dass die IgG-Werte bei allen unbehandelten Kühen niedrig waren. Der Antikörpertiter in der Behandlungsgruppe zeigte schon nach der ersten Applikationsserie von 75 mg einen statistisch signifikanten Anstieg. Vergleicht man die Werte der LBE in Abhängigkeit von der applizierten Dosis, so wird deutlich, dass nach der ersten Applikationsserie von 100 mg behandelte Kühe die höchsten Antikörpertiter aufwiesen (573 LBE). Trotzdem alle Kühe der Behandlungsgruppe nach ähnlichem Muster reagierten, verlief die Ausbildung der Antikörper individuell unterschiedlich schnell. Die IgG-Konzentrationen der Kontrollgruppe blieben bis zum Ende der Behandlung konstant niedrig.

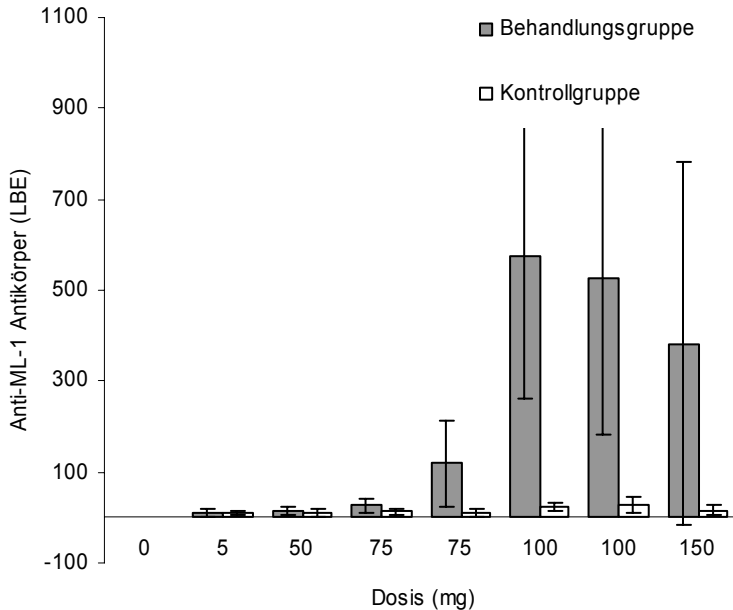


Abbildung 10: Arithmetische Mittelwerte der Anti-ML-1 Antikörper (IgG, \pm SA) pro Dosisstufe in beiden Gruppen im Verlauf der Behandlung. Die Werte der IgG in der BG und KO wurden vor Behandlungsbeginn nicht bestimmt. Die Zahlenwerte stellen die Lektin bindenden Einheiten (LBE) dar.

Um die Reaktivität auf der zellulären Ebene zu untersuchen, wurde vor und während der Behandlung in beiden Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Anteil der verschiedenen Blutzellen (Blutzellfraktionen) bestimmt. Die Analyse der Lymphozytenzahl zeigte keine signifikante Veränderung in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Mittelwerte der Lymphozyten in beiden Gruppen verliefen während der Behandlung parallel. In der Behandlungsgruppe (BG) zeigten die Werte bis zur Dosis von 75 mg eine Abnahme und erreichten nach der ersten Serie von 100 mg wieder die Ausgangswerte, um dann im weiteren Verlauf der Behandlung wieder langsam abzusinken. Der Mittelwert der Lymphozytenzahl in der BG blieb im Verlauf der Behandlung unter dem Wert vor der Behandlung (2889/ μ l). Auffällig war, dass bei allen Kühen der prozentuale Anteil der Lymphozyten vor oder während der Behandlung unter dem Referenzwert von 45-65% blieb (Rosenberger, 1990). Dabei zeigte sich, dass die

Abnahme des Lymphozyten-Anteils zu Gunsten der eosinophilen und neutrophilen Granulozyten erfolgte, die bei nahezu allen Kühen höher waren als die Referenzwerte (Rosenberger, 1990). Bei vier Kühen in der BG blieb auch die absolute Zahl der Lymphozyten bis zum Ende der Behandlung unter der Norm. Bei den anderen Kühen erschienen niedrige Werte zu unregelmässigen Zeitpunkten im Verlauf der Behandlung.

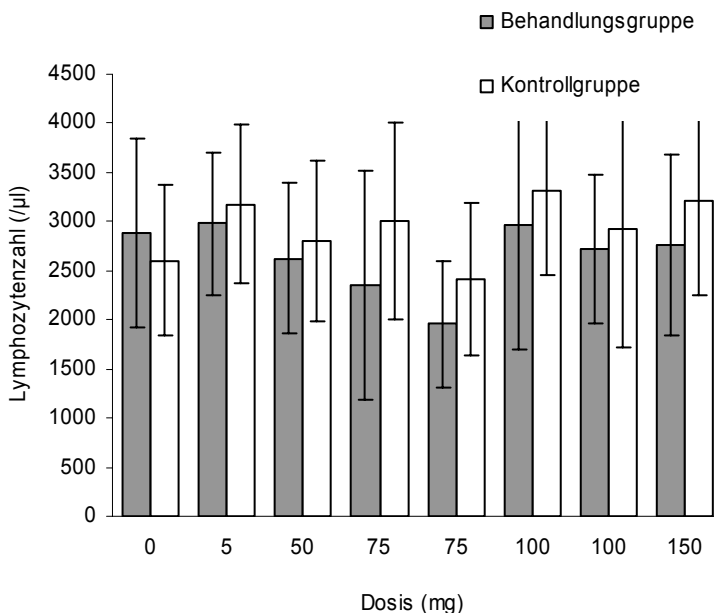


Abbildung 11: Arithmetische Mittelwerte der Lymphozytenzahl je ml Blut (\pm SA) pro Dosisstufe in beiden Gruppen vor und während der Behandlung.

Um zu genaueren Aussagen über den Anteil der beteiligten Lymphozytensubpopulationen zu kommen, wurden in weiteren FACS-Analysen einzelne Zellpopulationen bestimmt. Die Lymphozyten wurden dazu auf die Oberflächenmarker CD4 (T-Helfer-), CD8 (Suppressor-/Zytotoxischen T-) und CD21 (B-Zellen) untersucht.

Die Analysen ergaben für den Mittelwert der CD4- und CD8-Zellen in der BG nach der Dosisserie von 75 mg und 150 mg einen leichten, nicht signifikanten Anstieg des prozentualen Anteils (Abb. 12 a und 13 a), wenn auch bei den absoluten Werten eine Abnahme zu verzeichnen war (Abb. 12 b und 13 b).

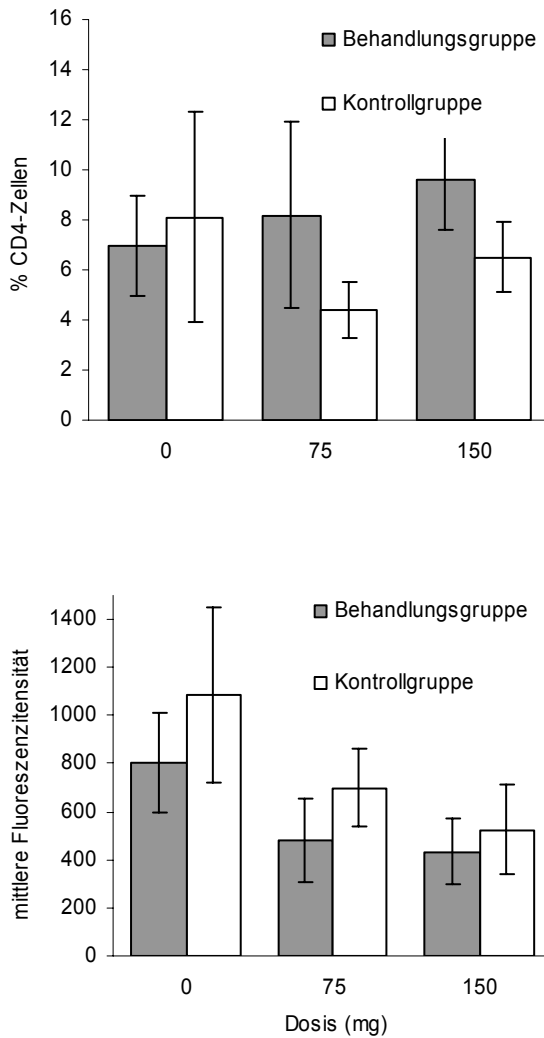


Abbildung 12: Expression der CD4- (T-Helfer-) Zellen (\pm SA) im Blut von 6 chronisch Mastitis-kranken Kühen in jeder Gruppe, gemessen zu drei verschiedenen Testzeitpunkten: vor Behandlungsbeginn, in der Mitte und am Ende der Behandlung. Oben (a): Prozentzahl der CD4-Zellen; unten (b): mittlere Expressionsintensität der CD4-Zellen.

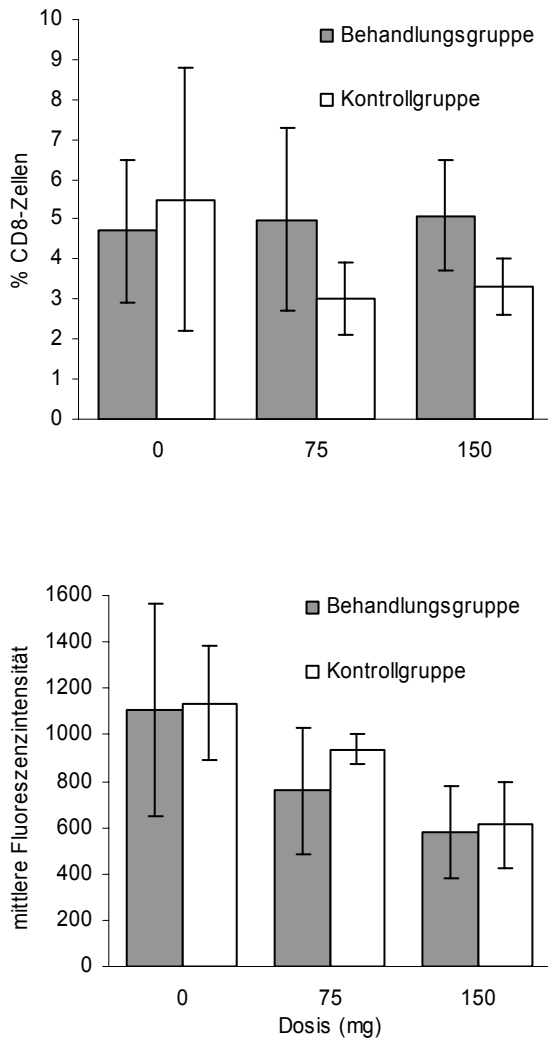


Abbildung 13: Expression der CD8- (Suppressor-/Zytotoxische T-) Zellen (\pm SA) im Blut von 6 chronisch Mastitis-kranken Kühen in jeder Gruppe, gemessen zu drei verschiedenen Testzeitpunkten: vor Behandlungsbeginn, in der Mitte und am Ende der Behandlung. Oben (a): Prozentzahl der CD8 Zellen; unten (b): mittlere Expressionsintensität der CD8-Zellen.

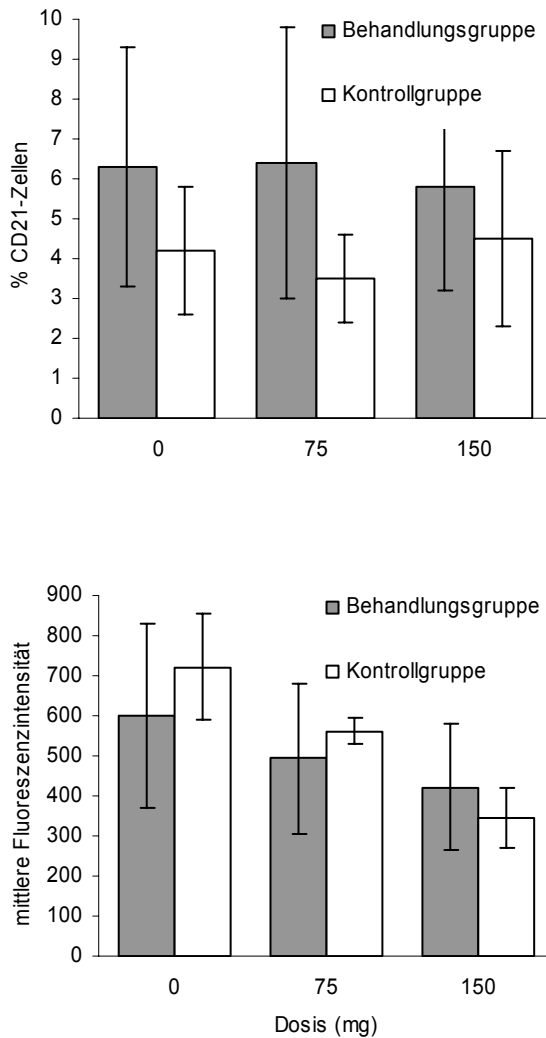


Abbildung 14: Expression der CD21 (B-Zellen, \pm SA) im Blut von 6 chronisch Mastitis-kranken Kühen in jeder Gruppe, gemessen zu drei verschiedenen Testzeitpunkten: vor Behandlungsbeginn, in der Mitte und am Ende der Behandlung. Oben (a): Prozentzahl der CD21-Zellen; unten (b): mittlere Expressionsintensität der CD21-Zellen.

Die absolute Anzahl der B-Zellen (CD21) nahm in beiden Gruppen im Verlauf der Behandlung ab. Diese Abnahme war aber nicht signifikant, und auch der prozentuale Anteil der B-Zellen zwischen beiden Gruppen zeigte keine statistisch signifikanten Veränderungen.

Da die Analysen der humoralen Reaktivität gegenüber Iscador® M bei allen Kühen im Verlauf der Behandlung einen statistisch signifikanten Anstieg der Antikörper vom IgG-Typ nachwiesen, sollte durch Vergleich mit der Lymphozytenzahl geklärt werden ob die zunehmende Ausbildung der Antikörper in Verbindung mit den Werten der Lymphozyten stand. Abb. 15 zeigt den Vergleich zwischen der Lymphozytenzahl und den Extinktionswerten der Antikörper ohne Berücksichtigung der verschiedenen Iscador®-Dosen. Eine Korrelation zwischen diesen beiden Immunparametern konnte nicht nachgewiesen werden. Nur bei einer Kuh zeigte sich ein möglicher Zusammenhang zwischen Lymphozytenzahl und Antikörperproduktion in Abhängigkeit von den verschiedenen Dosen.

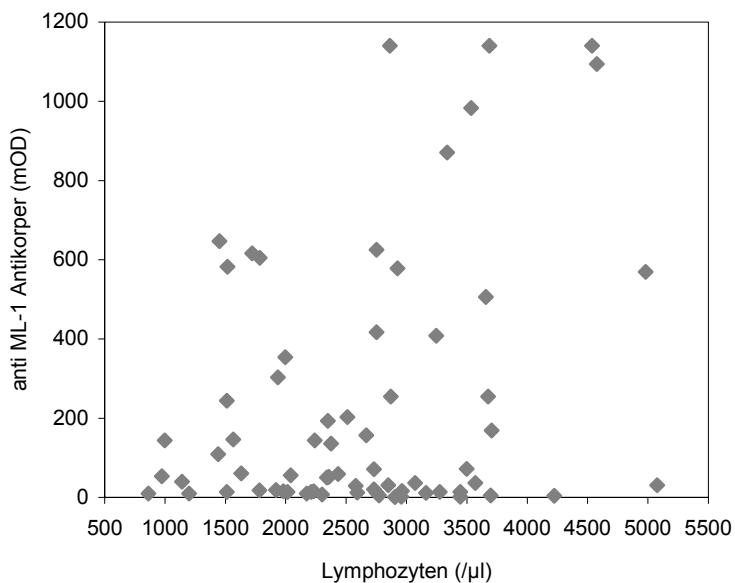


Abbildung 15: Vergleich zwischen der zellulären (Lymphozytenzahl) und humoralen (IgG) Immunantwort bei den chronisch Mastitis-kranken Kühen unter einer Iscador® M Behandlung. Berücksichtigt wurden dabei alle zu den unterschiedlichen Testzeitpunkten erhaltene Daten, unabhängig von den applizierten Dosen.

Die Blutzellanalysen zeigten zu keinem Behandlungszeitpunkt während der Applikationsphase einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Anzahl der neutrophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten und Monozyten zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe.

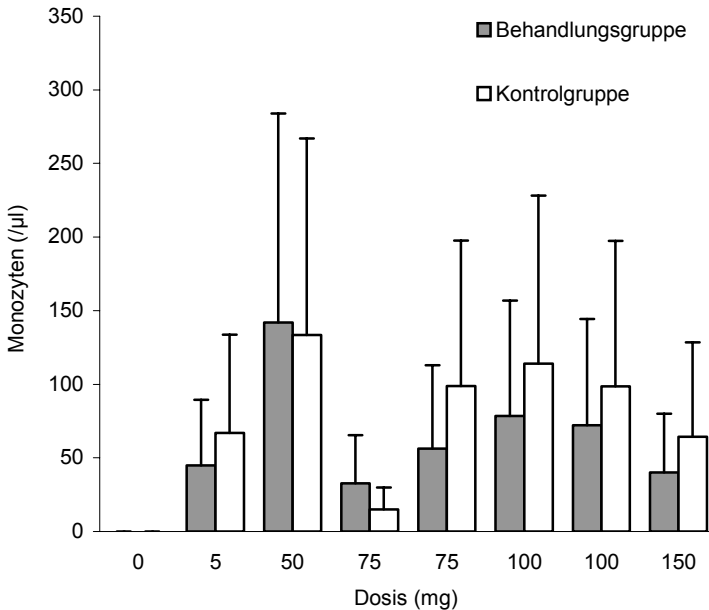


Abbildung 16: Arithmetische Mittelwerte der Monozyten (\pm SA) in beiden Gruppen vor und während der Behandlung. Vor Behandlungsbeginn waren die Werte der Monozyten bei allen Kühen unter der Nachweisgrenze.

Der Einfluss des Iscador®-Präparates auf die Phagozytoseaktivität der Monozyten wurde zu drei verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf der Behandlung untersucht. Der Test beruht auf der Messung der Phagozytose von opsonierten E. coli Bakterien durch Monozyten. Zwischen beiden Gruppen zeigten sich zu keinem Untersuchungszeitpunkt statistisch signifikante Unterschiede hinsichtlich der Phagozytoseaktivität der Monozyten.

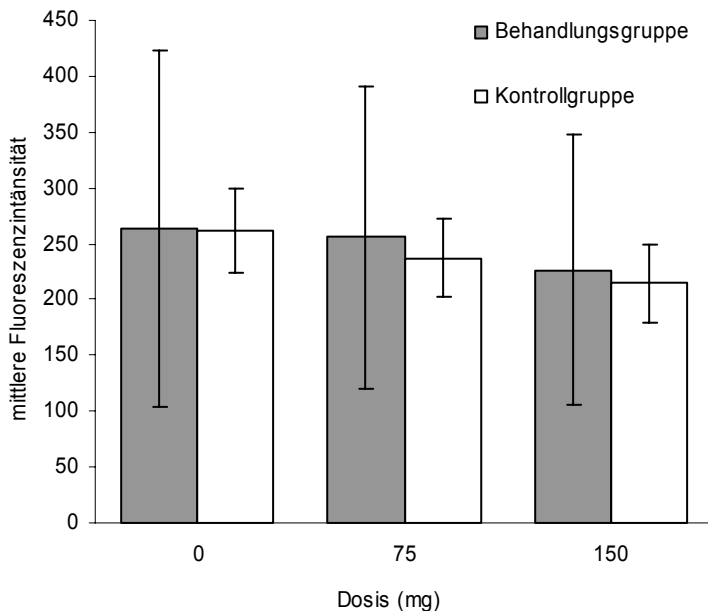


Abbildung 17: Phagozytoseaktivität der Monozyten (\pm SA) in beiden Gruppen gemessen zu drei verschiedenen Zeitpunkten, vor Behandlungsbeginn, in der Mitte und am Ende der Behandlung.

Milchanalysen

In der Milch wurden zu 3 verschiedenen Zeitpunkten unterschiedliche Zellpopulationen mit Hilfe der FACS-Analyse bestimmt. Untersucht wurden CD4 (T-Helfer-), CD8 (Suppressor-/Zytotoxische T-), CD21 (B-Zellen) und CD14 (Monozyten/Makrophagen). Hierbei wurden in jeder Gruppe nur 6 Milchproben aus 6 chronisch mit *St. aureus* infizierten Vierteln untersucht.

Die Mittelwerte der CD4-Zellen in der Milch zeigten in der BG bis auf ein Viertel keine signifikanten Unterschiede zu irgendeinem Zeitpunkt der Untersuchungen. In einem Viertel nahm die absolute Zahl der CD4-Zellen nach der Dosisserie von 75 mg um mehr als 2.5-fache zu, was auch einen Einfluss auf den Mittelwert der ganzen Gruppe hatte.

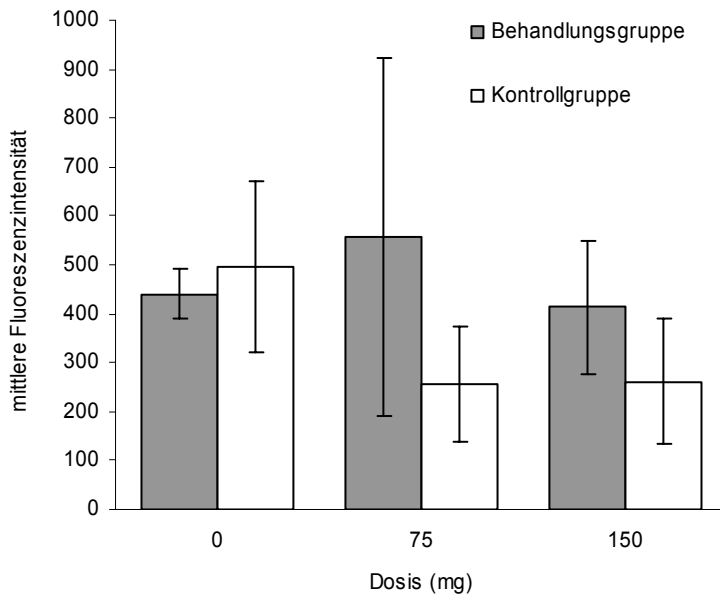


Abbildung 18: Mittlere Expressionsintensität der CD4⁺ (T-Helfer-) Zellen (\pm SA) in der Milch von 6 chronisch Mastitis-kranken Kühen in jeder Gruppe, gemessen zu drei verschiedenen Zeitpunkten: vor Behandlungsbeginn, in der Mitte und am Ende der Behandlung.

Die Applikation von Iscador® führte im Mittel zu keinen signifikanten Veränderungen in allen Vierteln in beiden Gruppen beim absoluten sowie prozentuellen Anteil der CD8-Zellen.

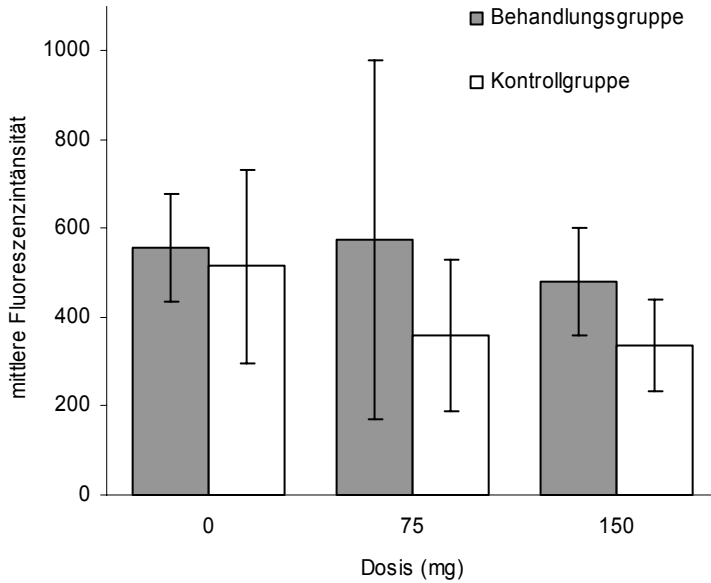


Abbildung 19: Mittlere Expressionsintensität der CD8- (Suppressor-/Zytotoxische T-) Zellen (\pm SA) in der Milch von 6 chronisch Mastitis-kranken Kühen in jeder Gruppe, gemessen zu drei verschiedenen Zeitpunkten: vor Behandlungsbeginn, in der Mitte und am Ende der Behandlung.

Die Analysen ergaben für den Mittelwert der CD14-Zellen der Milch in der BG während der Dosisserie von 75 mg und 150 mg einen signifikanten Anstieg der absoluten Zellzahl. Bei den Analysen der einzelnen Euterviertel zeigte sich in vier Vierteln in der Behandlungsgruppe eine deutliche Zunahme der CD14-Zellen, in einem Viertel sogar um mehr als das 3-fache.

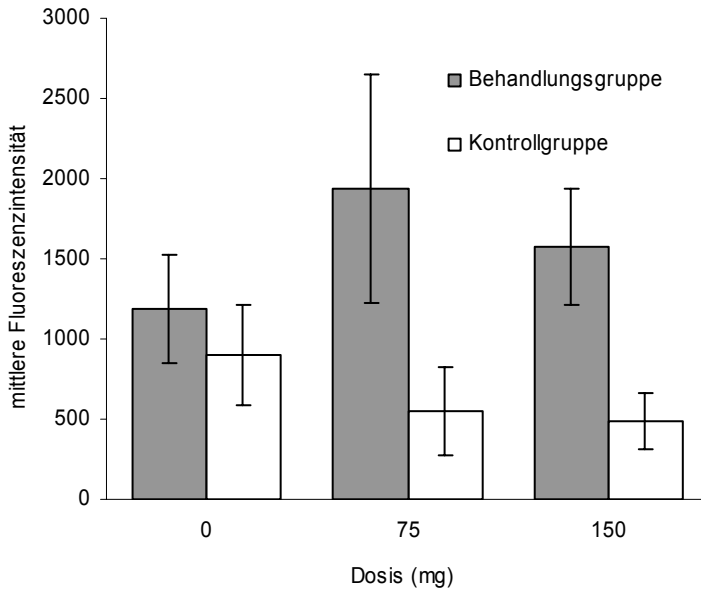


Abbildung 20: Mittlere Expressionsintensität der CD14 (Monozyten/Makrophagen, \pm SA) in der Milch von 6 chronisch Mastitis-kranken Kühen in jeder Gruppe, gemessen zu drei verschiedenen Zeitpunkten: vor Behandlungsbeginn, in der Mitte und am Ende der Behandlung.

Die Mittelwerte der absoluten Anzahl der CD21-Zellen zeigten in der BG und in der Kontrollgruppe keine signifikanten Veränderungen.

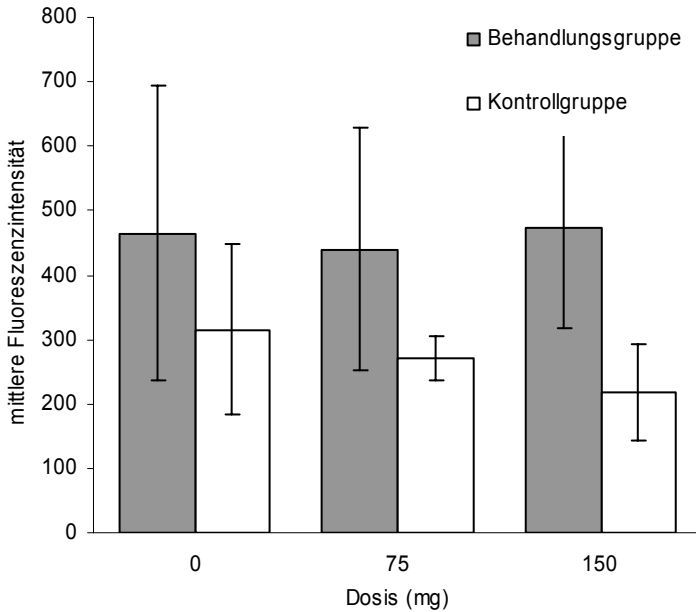


Abbildung 21: Mittlere Expressionsintensität der CD21- (B-Zellen, \pm SA) in der Milch von 6 chronisch Mastitis-kranken Kühen in jeder Gruppe, gemessen zu drei verschiedenen Zeitpunkten: vor Behandlungsbeginn, in der Mitte und am Ende der Behandlung.

Viertelgemelksproben wurden wöchentlich auf ihren Gehalt an somatischen Zellen geprüft. Die Mittelwerte der Zellzahl in der BG und der Kontrollgruppe sanken im Verlauf der Behandlung langsam ab. Im Verlauf der Behandlung zeigten sich zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden jedoch deutliche individuelle Unterschiede zwischen den Kühen beobachtet.

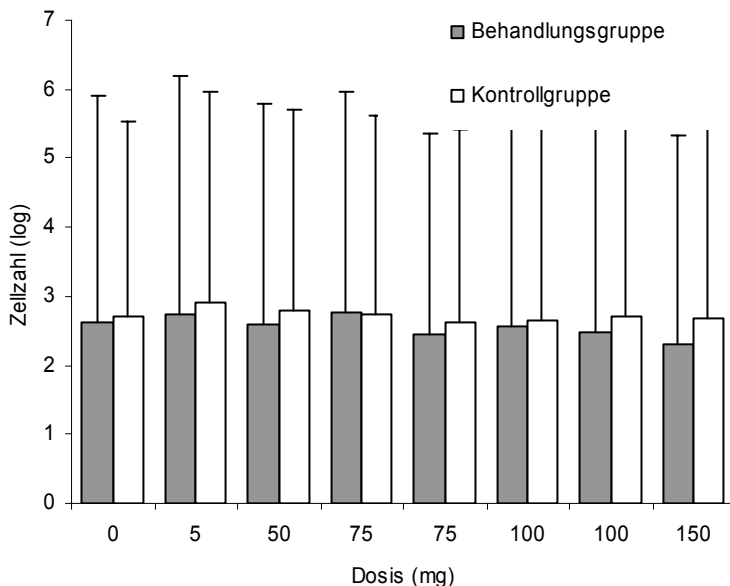


Abbildung 22: Logarithmierte mittlere Werte der Zellzahl (+/- SA) in der Milch in beiden Gruppen vor und während der Behandlung mit Iscador® M.

Die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchungen sind in Tabelle 20 dargestellt. *St. aureus* wurde vor der Behandlung in der Behandlungsguppe in 7 Vierteln und in der Kontrollgruppe in 11 Vierteln diagnostiziert. Während der Anteil der infizierten Viertel in der Kontrollgruppe (KO, n=10 und n=11) im Verlauf der Behandlung relativ konstant blieb, zeigte er in der BG am Ende der Behandlung eine Zunahme (von n=5 auf n=9). Deutliche Unterschiede konnten zwischen beiden Gruppen beim Anteil der mit anderen Streptokokken infizierten Viertel schon vor der Behandlung ermittelt werden. In der BG wurden andere Streptokokken in 13 Vierteln und in KO in 3 Vierteln diagnostiziert. Der Anteil der mit anderen Streptokokken infizierten Viertel in der KO variierte innerhalb des Behandlungszeitraums, während die Streptokokkeninfektionen in der BG bei Behandlungsende eher eine abnehmende Tendenz aufwiesen.

Tabelle 20: Bakteriologische Untersuchungen der Milch der chronisch Mastitis kranken Kühen in beiden Gruppen zu drei verschiedenen Zeitpunkten: A vor Behandlungsbeginn, B in der Mitte der Behandlung, C am Ende der Behandlung.

	St. aureus			Andere Staphylok.			Andere Streptok.		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
BG									
Zahl der Viertel	7	5	9	2	1	0	13	9	6
KO									
Zahl der Viertel	11	10	11	2	1	0	3	7	2

Nebenwirkungen der Iscador®-Behandlung

Die Verträglichkeit von Iscador® M beim Rind ist gut. Ausser der unscharf begrenzten entzündlichen Reaktion an der Injektionsstelle, die in der Humanmedizin als gewünschter Indikator für das Erreichen der Zieldosis gilt, konnten keine klinisch erfassbaren Nebenwirkungen nachgewiesen werden.

9.4 Diskussion

In den letzten Jahren wurde in der Literatur verstärkt über eine positive Beeinflussung von Krebserkrankungen durch Mistel-Präparate berichtet. Der Grund zur klinischen Anwendung in der Humanmedizin liegt:

1. in der zytotoxischen Wirkung auf maligne Zellen, welche in vitro mit verschiedenen Tumorzelllinien sowie in vivo an Krebspatienten und in Tierexperimenten überprüft wurde (Weber et al., 1998, Salzer, 1986, Ribàreau-Gayon et al., 1986, Khwaja et al., 1986).
2. an den stimulierenden Effekten auf verschiedene Zellen des Immunsystems die in vivo und in vitro bei Mensch und Tier überprüft wurden (Beuth et al., 1992, 1993, 1994, 1995, Metzner et al., 1985, Stein, 1995, Klett, 1989).

Derartige Studien wurden im Wesentlichen bei Krebspatienten und Versuchstieren durchgeführt. Angaben über Untersuchungen der Wirksamkeit von Iscador® bei chronischen Entzündungen oder zur zellulären und humoralen Immunantwort bei Haus- und Nutztieren unter Iscador®-Behandlung wurden in der Literatur nicht gefunden. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit der Einfluss einer Iscador®-Behandlung auf die zellulären und humoralen Immunparameter bei chronisch an Mastitis erkrankten Kühen untersucht werden.

Das Blutplasma der Kühe wurde zunächst auf die anti-ML-1 Antikörpertiter vom IgG-Typ untersucht. Während der Antikörpertiter bei den Kontrolltieren bis zum Ende der Behandlung konstant niedrig blieb, zeigte sich in der Behandlungsgruppe im höheren Dosisbereich (ab 100 mg/Tier) eine signifikante Zunahme der anti-ML-1 Antikörper. Dabei fiel auf, dass Anti-ML-1 Antikörper vom IgG-Typ bei allen unbehandelten Kühen nachgewiesen werden konnten, obwohl sie vor Studienbeginn noch nicht mit Iscador® M und mit hoher Wahrscheinlichkeit auch nicht mit nativen Mistelpflanzen in Kontakt gekommen waren. Der Einfluss der Antigenexposition auf die Geschwindigkeit der Antikörperproduktion und die Menge der Antikörper war individuell unterschiedlich. Es scheint, dass der Antikörpertiter von der Dosis sowie von individuellen Faktoren abhängig ist (Stettin et al., 1990, Stein, 1995).

Gleichzeitig mit der Analyse der humoralen Immunreaktion wurden auch Veränderungen in den Konzentrationen der verschiedenen Blutzellen des spezifischen sowie unspezifischen Immunsystems bestimmt. Bei Mäusen wurde eine statistisch signifikante Zunahme der Lymphozytenzahl und –aktivität nach Applikation von ML-1 beobachtet (Beuth et al., 1994). Die gleiche Arbeitsgruppe beschreibt eine Zunahme der Gesamt-T- und CD4-Zellen und

geringere Effekte bei den B- und T-Suppressor-Zellen nach Applikation von ML-1 bei Tumorpatienten (Beuth et al., 1992). Kovacs et al., (1991) berichten von einer signifikanten Zunahme der CD4 und CD8-Zellen nach intravenöser und subkutaner Verabreichung von Iscador® M bei Krebspatienten. Chernyshov et al. (1997) findet bei Kindern unter Behandlung eine signifikante Zunahme der Lymphozytenzahl und Haupt-Lymphozytensubpopulationen (CD3, CD19, CD3-/CD16+CD56+). Neben einer signifikanten Zunahme der niedrigen Werte der Zellpopulationen bewirkte Iscador® M auch eine Senkung der erhöhten Werte der CD4/CD3- und CD3/CD8-Quotienten auf das Normalniveau, hatte hingegen keinen Effekt bei normalen Werten. Die Autoren sprechen daher von einer eher immunoregulierenden Eigenschaft von Iscador® M.

In den vorliegenden Untersuchungen an chronisch kranken Kühen hatte Iscador® M keinen Einfluss auf die gesamte Lymphozytenzahl sowie auf die Zahl verschiedener Subpopulationen der Lymphozyten. Die in der Literatur angegebene absolute Zahl der Lymphozyten für erwachsene, klinisch gesunde Rinder liegt zwischen 2500 und 5500/μl (Rosenberger, 1990). In der vorliegenden Arbeit blieben die Werte der Lymphozyten bei 3 mit Iscador® behandelten Tieren bis zum Ende der Behandlung unter dem normalen Niveau. Subnormale Werte erschienen auch bei Kühen der Kontrollgruppe zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf der Behandlung. Die Analysen der einzelnen Kühe hinsichtlich der Lymphozytenzahl zeigten sehr grosse Unterschiede zwischen den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten.

Die Markierung mit fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörpern, die gegen unterschiedliche Oberflächenmarker gerichtet waren, konnte bei den Lymphozytensubpopulationen im Blut keine signifikanten Veränderungen im Profil der CD4-, CD8- und CD21-Zellen nachweisen. Im Blut nahmen die absolute Werte der verschiedenen Zellpopulationen sogar ab.

In der Literatur wurden auch stimulierende und modulierende Effekte von Iscador® M oder ML-1 auf andere Blutzellen beschrieben (Beuth et al., 1994, 1995, Stein und Berg, 1996, Salzer, 1986). In der vorliegenden Studie konnten in keinem Fall ähnliche Effekte bei Monozyten, neutrophilen Granulozyten sowie eosinophilen Granulozyten nachgewiesen werden.

Ein Grund für das Fehlen von immunstimulierenden Effekten von Iscador® bei den Versuchskühen dürfte in der ätiologischen sowie pathologischen Verschiedenartigkeit der Erkrankungskomplexe von Krebs und Mastitis liegen. Es muss betont werden, dass die Iscador®-Präparate als spezifische Krebsheilmittel in die medizinische Praxis eingeführt wurden und noch immer angewendet werden. Verschiedene Studien sprechen von einer

Verstärkung der gegen den Tumor gerichteten entzündlichen Abwehrmechanismen sowie über die Anregung und Stärkung des Immunsystems durch Immunstimulation und -modulation (Beuth et al., 1992, 1993, 1994, 1995, Metzner et al., 1985, Stein, 1995, Klett, 1989). Die Präparate aus verschiedenen Mistel-Arten sollen sogar eine krebsspezifische Wirkung besitzen (Matthiessen und Tröger, 1995, Weleda, 1999). Andererseits stellt sich auch die Frage, ob die Ergebnisse der humanmedizinischen Studien unmittelbar auf andere Spezies übertragbar sind.

Im Vergleich der zellulären (Lymphozyten) und humoralen Reaktion gegenüber Iscador® M konnte nachgewiesen werden, dass die Reaktivität nahezu ausschliesslich humoraler Natur war. In keinem Fall konnte eine höhere Lymphozytenproliferation bei gleichzeitiger Antikörperausbildung beobachtet werden. Da in der vorliegenden Studie nur die Lymphozytenzahl und einige bestimmte Subpopulationen ermittelt wurden, lässt sich jedoch eine eventuell aufgetretene Proliferation der anderen Subpopulationen nicht ausschliessen. Allerdings spielen diese für die Immunitätsausprägung in der vorliegenden Fragestellung eine untergeordnete Rolle.

Gleichzeitig mit der Analyse der zellulären Reaktion und der Antikörperproduktion wurde die Phagozytoseaktivität der Monozyten gegenüber Iscador® M untersucht. In der Literatur lassen sich Angaben zur Phagozytosestimulierung der Monozyten durch die B-Kette des ML-1 finden. Stirpe et al. (1982) berichtete, dass Makrophagen der Maus durch ML-1 aktiviert wurden. Metzner et al. (1985) fanden ähnliche Resultate bei Meerschweinchenmakrophagen. Die Autoren beobachteten, dass die B-Kette der ML-1 für die Steigerung der Phagozytoseaktivität verantwortlich war, während die A-Kette keine Veränderungen bei Makrophagen verursachte. Diese Aussage bestätigend fanden Metzner et al. (1985), dass die B-Kette die Phagozytose-Kapazität bei menschlichen Leukozyten steigerte, nicht aber das gesamte Lektin oder die A-Kette. Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen zeigten, dass das Iscador®-Präparat keinen Einfluss auf die Phagozytoseaktivität der Monozyten ausübte, wobei sich bei allen Kühen in der Behandlungsgruppe sehr grosse intraindividuelle Unterschiede offenbarten.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit betraf die Frage, ob die chronische Mastitis gemessen an der somatischen Zellzahl und an den bakteriologischen Befunden in der Milchdrüse durch die Veränderungen auf der zellulären und humoralen Ebene beeinflusst werden kann.

Bei den FACS-Analysen der Milch konnten keine statistisch signifikanten Veränderungen des prozentualen sowie absoluten Anteils der CD8-, CD4- und CD21-Zellen sowie Monozyten nachgewiesen werden. Bei zwei Kühen zeigte sich eine Zunahme bei allen Zellpopulationen. Da aber gleichzeitig keine Veränderungen im Blutzellmuster zu ermitteln

waren, müssen andere lokale Faktoren für die Zunahme der Zellpopulationen verantwortlich sein. Ob diese mit der Mistelbehandlung in Zusammenhang stehen, bleibt Spekulation, erscheint aber aufgrund des systemischen Behandlungsregimes eher unwahrscheinlich.

Zytobakteriologische Analysen der Milch im Verlaufe der Behandlung zeigten, dass die Zellzahl in der Behandlungsgruppe und der Kontrollgruppe trotz unverändertem bakteriologischen Bild abnahm. Die beschriebene Abnahme der Zellzahl unter der Behandlung steht mit hoher Wahrscheinlichkeit vorwiegend in direktem Zusammenhang mit guter Haltung und Melktechnik, ein Umstand dessen Allgemeingültigkeit in verschiedenen Untersuchungen belegt werden konnte (Barkema et al., 1998, Bartlett et al., 1992, Erskine et al., 1987, Faye et al., 1997, Goodger et al., 1993, Hutton et al., 1990).

In der vorliegenden Studie wurden Dosierungen von 1 bis 150 mg Iscador® M pro Tier appliziert, was bei einer 600-650 kg schweren Kuh einem Dosisbereich von 0.0016 (0.0015) – 0.25 (0.23) mg/kg KG des fermentierten, wässrigen Auszugs aus *Viscum album* entspricht. Vergleicht man die Dosen in der vorliegenden Arbeit mit den in der Humanmedizin applizierten Dosen (Hajto, 1986, Hajto und Lanzrein, 1986, Kovacs et al. 1991) ist zu vermuten, dass die Dosen hoch genug waren, um eine Immunreaktion auf der zellulären Ebene zu verursachen. Warum diese Reaktionen dennoch ausblieben, ist anhand der vorliegenden Daten nicht zu erklären.

10 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte eindeutig gezeigt werden, dass es bei gesunden wie kranken Kühen im Verlauf einer Behandlung mit Mistelextrakt-Iscador® M nur zu einer humoralen Reaktion gegenüber dem Mistelextrakt kommt. Eine Stimulation verschiedener Zelltypen, wie sie in der Humanmedizin bei der Krebstherapie von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben wurde, konnte hingegen nicht gefunden werden.

Iscador® greift auf der zelluläre Ebene in die krankmachenden Prozesse ein, indem es durch eine selektive zelltoxische Wirkung die Tumorzellen direkt angreifen kann, ohne gesundes Gewebe zu schädigen, eine Fähigkeit die hauptsächlich den Viscotoxinen und Mistellektinen zugeschrieben wird (Weber et al., 1998, Salzer, 1986, Ribéreau-Gayon et al., 1986, Khwaja et al., 1986). Das geschieht durch die Anregung und Stärkung des Immunsystems durch Immunostimulation und -modulation (Beuth et al., 1992, 1993, 1994, 1995, Metzner et al., 1985, Stein, 1995, Klett, 1989).

Die Verhältnisse bei der chronischen Mastitis liegen dagegen grundlegend anders. Zwar ist auch hier die lokale Immunabwehr reduziert, was aber durch Pathogenitätsfaktoren der ursächlich beteiligten Mikroorganismen sowie möglicherweise durch eine in der Regel intakte Blut-Euter-Schranke bedingt ist. Auf der Basis des Blutbildes kann vermutet werden, dass auch bei chronisch infizierten Kühen das Immunsystem intakt ist. Die Daten der vorliegenden Arbeit unterstützen diese Vermutung. Hingegen schien die nötige lokale Abwehr nicht auszureichen, um die Pathogenität der Mastitisekeime im Gewebe zu regulieren. Darüber hinaus liegen bei der chronischen Mastitis im Euterparenchym Veränderungen im Bindegewebe vor, die durch Immunreaktionen jedwelcher Art nicht beeinflussbar sind.

Die Ergebnisse aus der Humanmedizin lassen des weiteren folgern, dass die Aufklärung des Wirkungsmechanismus der Mistelextrakte eine genauere Charakterisierung der Einzelsubstanzen sowie die Standardisierung der Extrakte voraussetzt (Stettin, 1992). Die Inhaltsstoffe bzw. deren Konzentrationen sind bei Iscador®-Präparaten trotz gleicher Wirtsbäume und gleicher Serie untereinander verschieden, da es sich jeweils um unterschiedlich konzentrierte wässrige Gesamtextrakte handelt (Bocci, 1993). Unterschiedliche Substanzkonzentrationen sind allein schon durch unterschiedliche Erntezeitpunkte gegeben (Gabius et al., 1994).

In vielen humanmedizinischen Untersuchungen wurde das individuelle Verhalten der verschiedenen Immunparameter bei verschiedenen Patienten immer wieder deutlich

(Stein, 1995). Daher ist die in letzter Zeit propagierte standardisierte Dosierung von 1 ng ML-1/kg KG vielleicht auch nicht für alle Tierarten zu akzeptieren. Es ist auch fraglich, ob die bei humanmedizinischen Patienten beschriebenen Ergebnisse unmittelbar auf andere Spezies übertragbar sind.

Es wäre von grossem Interesse, in einer weiteren Studie den Einfluss von verschiedenen Mistelpräparaten, die nach Firmenangaben auf einen festgelegten und konstanten Gesamtlektiningehalt sowie einzelner Mistellektine bestimmt sind, auf das spezifische und unspezifische Immunsystem bei verschiedenen Tieren zu untersuchen.

11 Literatur

- Adlam, C., Kerry, J. B., Edkins, S. And Ward, P. D. (1981). "Local and systemic antibody responses in cows following immunization with staphylococcal antigens in the dry period." J Comp Pathol 91: 105.
- Almeida, R. A., Luther, D. A. and Kumar, S. K. (1996). "Adherence of *Streptococcus uberis* to bovine mammary epithelial cells and extracellular matrix proteins." J Vet Med B 43: 385.
- Almeida, R. A. and Oliver, S. P. (1993). "Antiphagocytic effect of the capsule of *Streptococcus uberis*." J Vet Med B 40: 707.
- Anderson, J. C. (1982). "Progressive pathology of staphylococcal mastitis with a note on control, immunization and therapy." Vet Rec 110: 372.
- Ashwell, G. and Marell, A. G. (1974). "The role of carbohydrates in the hepatic recognition of circulation glycoproteins. " Adv Enzymol 41: 99.
- Barkema, H. W., Schukken, Y. H., Lam, T. J., Beiboer, M. L., Benedictus, G. and Brand, A. (1998). "Management practices associated with low, medium, and high somatic cell counts in bulk milk. " J Dairy Sci 81: 1917.
- Barondes, S. H. (1981). "Lectins: Their mutible endogenous cellular functions. " Am Rev Biochem 50: 207.
- Bartlett, P. C., Miller, G. Y., Lance, S. E, Hancock, D. D. and Heider, L. E. (1992). "Managerial risk factors of intramammary infection with *Streptococcus agalactiae* in dairy herds in Ohio." Am J Vet Res 53 : 1715.
- Becker, H. (1986). "Botany of European mistletoe (*Viscum album* L.)." Oncology 43 Suppl 1: 2.
- Beuth, J., Gabius, H. J., Steuer, M. K., Geisel, J., Steuer, M., Ko, H. L. and Pulverer, G. (1993). "Effect of mistletoe lectin therapy on serum level of defined serum proteins (acute phase proteins) in tumor patients." Med Klin 88: 287.
- Beuth, J., Ko, H. L., Gabius, H. J., Burrichter, H., Oette, K. and Pulverer, G. (1992). "Behavior of lymphocyte subsets and expression of activation markers in response

- to immunotherapy with galactoside-specific lectin from mistletoe in breast cancer patients." *Clin Investig* 70: 658.
- Beuth, J., Ko, H. L., Gabius, H. J. and Pulverer, G. (1991). "Influence of treatment with the immunomodulatory effective dose of the beta-galactoside-specific lectin from mistletoe on tumor colonization in BALB/c-mice for two experimental model systems." *In Vivo* 5: 29.
- Beuth, J., Ko, H. L., Tunggal, L., Buss, G., Jeljaszewicz, J., Steuer, M. K. and Pulverer, G. (1994). "Immunoprotective activity of the galactoside-specific mistletoe lectin in cortisone-treated BALB/c-mice." *In Vivo* 8: 989.
- Beuth, J., Stoffel, B., Ko, H. L., Jeljaszewicz, J. and Pulverer, G. (1995). "Immunomodulating ability of galactoside-specific lectin standardized and depleted mistletoe extract." *Arzneimittelforschung* 45: 1240.
- Birgersson, A., Jonsson, P. and Holmberg, O. (1992). "Species identification and some characteristics of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine udders." *Vet Microbiol* 1: 181.
- Bocci, V. (1993). "Mistletoe (VISCUM ALBUM) lectins as cytokine inducers and immunoadjuvant in tumor therapy. A review." *Biol Regulators and Homeostatic Agents* 7: 1.
- Boddie, R. L., Nickerson, S. C. and Sutherland, S. F. (1990). "Use of modified antibiotic infusion syringes reduces mastitis." *Agri-Practice* 11: 6.
- Bramley, A. J. (1984). "Streptococcus uberis udder infection--a major barrier to reducing mastitis incidence." *Br Vet J* 140: 328.
- Bramley, A. J. and Dodd, F. H. (1984). "Reviews of the progress of dairy science: mastitis control--progress and prospects." *J Dairy Res* 51: 481.
- Brown, M. B. and Scasserra, A. E. (1990). "Antimicrobial resistance in streptococcal species isolated from bovine mammary glands." *Am J Vet Res* 51: 2015.
- Browning, J. W., Mein, G. A., Barton, M., Nicholls, T. J. and Brightling, P. (1990). "Effects of antibiotic therapy at drying off on mastitis in the dry period and early lactation." *Aust Vet J* 67: 440.
- Calzolari, A., Giraudo, J. A., Rampone, H., Odierno, L., Giraudo, A. T., Frigerio, C., Bettera, S., Raspanti, C., Hernandez, J., Wehbe, M., Mattea, M., Ferrari, M., Larriestra, A.

- and Nagel, R. (1997). "Field trials of a vaccine against bovine mastitis. 2. Evaluation in two commercial dairy herds." *J Dairy Sci* 80: 854.
- Chernyshov, V. P., Omelchenko, L. I., Heusser, P., Slukvin, I. I., Vodyanik, M. A., Galazyuk, L. V., Vykhovanets, E. V., Pochinok, T. V., Chernyshov, A. V., Gumenyuk, M. E. and Schaefermeyer, H. (1997). "Immunomodulatory actions of *Viscum album* (Iscador) in children with recurrent respiratory disease as a result of the Chernobyl nuclear accident." *Complem Therap Med* 5: 141.
- Craven, N. and Anderson, J. C. (1979). "The location of *Staphylococcus aureus* in experimental chronic mastitis in the mouse and the effect on the action of sodium cloxacillin." *Br J Pathol* 60: 453.
- Daley, M. J., Coyle, P. A., Williams, T. J., Furda, G., Dougherty, R. and Hayes, P. W. (1991). "Staphylococcus aureus mastitis: pathogenesis and treatment with bovine interleukin-1 beta and interleukin-2." *J Dairy Sci* 74: 4413.
- Daley, M. J., Furda, G., Dougherty, R., Coyle, P. A., Williams, T. J. and Johnston, P. (1992). "Potentiation of antibiotic therapy for bovine mastitis by recombinant bovine interleukin-2." *J Dairy Sci* 75: 3330.
- Danuser, J. and Gaillard, C. (1990). "Diseases and culling of Swiss dairy cows. 2. Culling and relation between diseases and milk production parameters." *Schweiz Arch Tierheilkd* 132: 301.
- De Oliveira, A. P., Watts, J. L., Salmon, S. A. and Aarestrup, F. M. (2000). "Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and the United States." *J Dairy Sci* 83: 855.
- Dietrich, J. B., Ribereau Gayon, G., Jung, M. L., Franz, H., Beck, J. P. and Anton, R. (1992). "Identity of the N-terminal sequences of the three A chains of mistletoe (*Viscum album* L.) lectins: homology with ricin-like plant toxins and single-chain ribosome-inhibiting proteins." *Anticancer Drugs* 3: 507.
- Dodd, F. H. (1983). "Mastitis-progress on control." *J Dairy Sci* 66: 1773.
- Doymaz, M. Z., Sordillo, L. M., Oliver, S. P. and Guidry, A. J. (1988). "Effects of *Staphylococcus aureus* mastitis on bovine mammary gland plasma cell populations and immunoglobulin concentrations in milk." *Vet Immunol Immunopathol* 20: 87.

- DVG (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, 1994). "Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Herdenproblem." „Subklinische Mastitis“ des Arbeitskreises „Eutergesundheit“. Kiel.
- DVG (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, 2002). "Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Bestandsproblem." Fachgruppe Milchhygiene. 4. Aufl., Gissen.
- Eberhart, R. J. (1986). "Management of dry cows to reduce mastitis." J Dairy Sci 69: 1721.
- Edmondson, P. W. (1989). "An economic justification of "blitz" therapy to eradicate *Streptococcus agalactiae* from a dairy herd." Vet Rec 9: 591.
- Engvall, E. (1980). "Enzyme immunoassay ELISA and EMIT." Meth Enzymol 71: 419.
- Erskine, R.J. and Eberhart, R. J. (1990). "Herd benefit-to-cost ratio and effects of a bovine mastitis control program that includes blitz treatment of *Streptococcus agalactiae*." J Am Vet Med Assoc 15: 1230.
- Erskine, R. J., Eberhart, R. J., Hutchinson, L. J. and Spencer, S. B. (1987). "Herd management and prevalence of mastitis in dairy herds with high and low somatic cell counts." J Am Vet Med Assoc 190 Suppl 11: 1411.
- Erskine, R. J. (1992). "Mastitis control in dairy herds with high prevalence of subclinical mastitis." Compend Contin Educ Pract Vet 14: 969.
- Faye, B., Lescouret, F., Dorr, N., Tillard, E., MacDermott, B. and McDermott, J. (1997). "Interrelationships between herd management practices and udder health status using canonical correspondence analysis." Prev Vet Med 32 Suppl 3-4: 171.
- Fox, L. K., Chester, S. T., Hallberg, J. W., Nickerson, S. C., Pankey, J. W. and Weaver, L. D. (1995). "Survey of intramammary infections in dairy heifers at breeding age and first parturition." J Dairy Sci 78: 1619.
- Fox, L. K., Liggitt, H. D., Yilma, T. and Corbeil, L. B. (1990). "The effects of interferon intramammary administration on mammary phagocyte function." J Vet Med 37: 28.
- Franz, H. (1985). "Ingredients of mistletoe (*Viscum album* L.) as potential drugs." Pharmazie 40: 97.
- Franz, H. (1986). "Mistletoe lectins and their A and B chains." Oncology 43 Suppl 1: 23.

- Franz, H., Kindt, A., Ziska, P., Bielka, H., Benndorf, R. and Venker, L. (1982). "The toxic A-chain of mistletoe lectin I: isolation and its effect on cell-free protein synthesis." *Acta Biol Med Ger* 41: 9.
- Franz, H., Ziska, P. and Kindt, A. (1981). "Isolation and properties of three lectins from mistletoe (*Viscum album* L.)." *Biochem J* 195: 481.
- Gabius, H. J., Gabius, S., Joshi, S. S., Koch, B., Schroeder, M., Manzke, W. M. and Westerhausen, M. (1994). "From ill-defined extracts to the immunomodulatory lectin: will there be a reason for oncological application of mistletoe?" *Planta Med* 60: 2. Review.
- Galanti, B., Paradisi, F., Mancici, A. and Giusti, G. (1968). "An early effect of *Staphylococcus alpha*-Toxin on cells growing in culture: ATP-levels in normal and intoxicated cells." *Pathol Microbiol* 32: 277.
- Garcia, M. L., Moreno, B. and Bergdoll, M. S. (1980). "Characterization of staphylococci isolated from mastitis cows in Spain." *Appl Environ Microbiol* 39: 548.
- Giraud, J. A., Calzolari, A., Rampone, H., Rampone, A., Giraud, A. T., Bogni, C., Larriestra, A. and Nagel, R. (1997). "Field trials of a vaccine against bovine mastitis. 1. evaluation in heifers." *J Dairy Sci* 80: 845.
- Goodger, W. J., Frank, G. G., Nordlund, K. V., Hilbelink, B. and Eisele, C. (1993). "Financial assessment of results of intervention to correct a housing-system problem on a dairy farm." *J Am Vet Med Assoc* 209: 1406.
- Gorter, R. W., Stein, J., Stoss, M. and Linderm, M. (1996). "Prospektive, longitudinale, dosiseskalierende, randomisierte Phase-1/2-Studie mit Iscador QuFrF und Iscador Qu Spezial mit HIV positiven, Krebspatienten und gesunden, nichtrauchenden Probanden." *Forsch. Komplementärmed* 3: 169.
- Gorter, R. W., van Wely, M., Stoss, M. and Wollina U. (1998). "Subcutaneous infiltrates induced by injection of Mistletoe extracts (Iscador). *Am J Ther* 5: 181.
- Graf, S., Haccius, M., Willer, H. (1999). "Die EU-Verordnung zur ökologischen Tierhaltung – Hinweise zur Umsetzung. 2. Aufl.; Stiftung Ökologie und Landbau (Sonderausgabe 72), Bad Dürkheim. "
- Gröhn, Y. T., Eicker, S. W., Ducrocq, V. and Hertl, J. A. (1998). "Effect of diseases on the culling of Holstein dairy cows in New York State." *J Dairy Sci* 81:966.

- Grossmann, D., Cook, R. G., Sparrow, J. T., Mollick, J. A. and Rich, R. R. (1990). "Dissociation of the stimulatory activities of staphylococcal enterotoxins for T cells and monocytes." *J Exp Med* 172: 1831.
- Hajto, T. (1986). "Immunomodulatory effects of iscador: a *Viscum album* preparation." *Oncology* 43 Suppl 1: 51.
- Hajto, T., Hostanska, K., Frei, K., Rordorf, C. and Gabius, H. J. (1990). "Increased secretion of tumor necrosis factors alpha, interleukin 1, and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to beta-galactoside-specific lectin from clinically applied mistletoe extract." *Cancer Res* 50: 3322.
- Hajto, T., Hostanska, K. and Gabius, H. J. (1989). "Modulatory potency of the beta-galactoside-specific lectin from mistletoe extract (IscaDor) on the host defense system in vivo in rabbits and patients." *Cancer Res* 49: 4803.
- Hajto, T. and Lanzrein, C. (1986). "Natural killer and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity activities and large granular lymphocyte frequencies in *Viscum album*-treated breast cancer patients." *Oncology* 43: 93.
- Hamann, J. (2002). "Qualitativ hochwertige „normale“ Großtierpraxis 3, 9: 12.
- Hamann, J. and Reichmuth, J. (1990). "Compensatory milk production within the bovine udder: effects of short-term non-milking of single quarters." *J Dairy Res* 57: 17.
- Hamprecht, K. and Anderer, F. A. (1990). "Autolytic generation of dialysable components in extracts of *Viscum album* exhibiting different mechanisms of enhancement of human NK-cytotoxicity against tumor cells." *Intern J Immunopath Pharm* 3: 63.
- Harmon, R. J., Crist, W. L., Hemken, R. W. and Langlois, B. E. (1986). "Prevalence of minor udder pathogens after intramammary dry treatment." *J Dairy Sci* 69: 843.
- Hassauer, W., Gutsch, J. and Burkhardt, R. (1979). "Welche Erfolgsaussichten bietet die Iscador- Therapie beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom?" *Onkologie* 2: 28.
- Heald, C. W. (1979). "Morphometric study of experimentally induced *Staphylococcus bovis* mastitis in the cow." *Am J Vet Res* 40: 1294.
- Hegi, G. (1980). "Illustrierte Flora von Mitteleuropa III." Verlag Paul Parey, Berlin.

- Hillerton, J. E., Bramley, A. J., Staker, R. T. and McKinnon, C. H. (1995). "Patterns of intramammary infection and clinical mastitis over a 5 year period in a closely monitored herd applying mastitis control measures." *J Dairy Res* 62: 39.
- Hillerton, J. E., Shearn, M. F., Teverson, R. M., Langridge, S. and Booth, J. M. (1993). "Effect of pre-milking teat dipping on clinical mastitis on dairy farms in England." *J Dairy Res* 60: 31.
- Hoblet, K. H., Bailey, J. S. and Pritchard, D. E. (1988). "Coagulase-positive staphylococcal mastitis in a herd with low somatic cell counts." *J Am Vet Med Assoc* 15: 777.
- Holly, M., Lin, Y. S. and Rogers, T. J. (1988). "Induction of suppressor cells by staphylococcal enterotoxin B: identification of a suppressor cell circuit in the generation of suppressor-effector cell." *Immunology* 64: 643.
- Hutton, C. T., Fox, L. K. and Hancock, D. D. (1990). "Mastitis control practices: differences between herds with high and low milk somatic cell counts." *J Dairy Sci* 73: 1135.
- Jain, N. C. (1979). "Common mammary pathogens and factors in infection and mastitis." *J Dairy Sci* 62: 128.
- Janssen, O., Scheffler, A. and Kabelitz, D. (1993). "In vitro effects of mistletoe extracts and mistletoe lectins. Cytotoxicity towards tumor cells due to the induction of programmed cell death (apoptosis)." *Arzneimittelforschung* 43: 1221.
- Jarisch, A. and Richter, H. (1940). "Zur Frage der Wirkstoffe in der Mistel." *Naun Schm Arch Exper Pathol Pharmacol* 195: 89.
- Jarp, J. (1991). "Classification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine clinical and subclinical mastitis." *Vet Microbiol* 27: 151.
- Jayarao, B. M., Gillespie, B. E., Lewis, M. J., Dowlen, H. H. and Oliver, S. P. (1999). "Epidemiology of *Streptococcus uberis* intramammary infections in a dairy herd." *Zentralbl Veterinarmed [B]* 46: 433.
- Jordan, E. and Wagner, H. (1986). "Structure and properties of polysaccharides from *Viscum album* (L.)." *Oncology* 43: 8.
- Kasche, S. (1995). "Pathogenese und Therapie der Staphylokokkenmastitis des Rindes. Eine Literaturstudie." Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover.

- Khwaja, T. A., Dias, C. B. and Pentecost, S. (1986). "Recent studies on the anticancer activities of mistletoe (VISCUM ALBUM) and its alkaloids." *Oncology* 43 suppl 1: 42.
- Kingwill, R. G., Neave, F. K., Dodd, F. H., Griffin, T. K., Westgarth, D. R. and Wilson, C. D. (1970). "The effect of a mastitis control system on levels of subclinical and clinical mastitis in two years." *Vet Rec* Jul 25: 87.
- Kjaer, M. (1988). "Mistletoe therapy of metastasizing renal cancer. A phase II study." *Ugeskr Laeger* 150: 1923.
- Klett, C. (1989). "Charakterisierung dialysierbarer Komponenten eines VISCUM ALBUM-Extrakts mit immunmodulatorischer Wirkung auf die natürliche Antitumor-Zytotoxizität beim Menschen." Dissertation, Universität für Biologie der Eberhard-Karls- Universität Tübingen, Tübingen.
- Klett, C. Y. and Anderer, F. A. (1989). "Activation of natural killer cell cytotoxicity of human blood monocytes by a low molecular weight component from viscum album extract." *Arzneim forsch* 39: 1580.
- Koch, F. E. (1938). "Untersuchungen über entzündungs- und nekroseerzeugende Wirkung von Viscum Album." *Z Ges Exp Med* 103: 740.
- Konopa, J., Woynarowski, J. M. and Lewandowska G. I. (1980). "Isolation of Viscotoxins. Cytotoxic basic polypeptides from Viscum album L." *Z Physiol Chem* 361: 1525.
- Kovacs, E., Hajto, T. and Hostanska, K. (1991). "Improvement of DNA repair in lymphocytes of breast cancer patients treated with VISCUM ALBUM extracts (Iscador)." *Eur. J. Cancer* 27: 1672
- Lacey, R. W. (1975). "Antibiotic resistance plasmids of Staphylococcus aureus and their clinical importance." *Bact Rev* 39: 1.
- Leigh, J. A. (1993). "Activation of bovine plasminogen by Streptococcus uberis." *FEMS Microbiol Lett* 15: 67.
- Leroi, R. (1981). "The possibilities of mistletoe therapy in cancer." *ZFA (Stuttgart)*. 57: 316.
- Levy, S. B., Fitzgerald, G. B. and Macone, A. B. (1976). "Changes in intestinal flora of farm personnel after introduction of a tetracycline-supplemented feed on a farm." *N Engl J Med* 295: 583.

- Licastro, F., Chiricolo, M., Barbieri, L., Stirpe, f., Falasca A., Rossi, C. A. and Franceschi, C. (1983). "Effect of 32 purified animal and plant lectins on human T-Lymphocytes." In: BØg-Hansen TC, Spengler GA (Ed.): *Lectins-Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. Valter de Gruyter 3: 302.
- Loeffler, D. A. (1986). "The immune response of the dairy cow to leukocidin from *Staphylococcus aureus*, and the effects of leukocidin on the mammary gland." *Diss Abstr int B* 47: 529.
- Lukyanova, E. M., Chernyshov, V. P., Omelchenko, L. I., Slukvin, I. I., Pochinok, T. V., Antipkin, J. G., Voichenko, I. V., Heusser, P. and Schnidermann, G. (1994). "Die Behandlung immunsupprimierter Kinder nach dem Tschernobyl-Unfall mit *Viscum album* (Iscador): klinische und immunologische Untersuchungen." *Forsch Komplementärmed* 1: 58.
- Luther, P. (1976). "The agglutination of human erythrocytes and mouse ascites tumor cells by extracts from mistletoe (*Viscum album* L.)." *Acta Biol Med Ger* 35: 123.
- Luther, P. and Becker, H. (1986). "Die Mistel-Botanik, Lektine, medizinische Anwendung." VEB Verlag/Springer Verlag, Heidelberg.
- Luther, P., Sehr, I., Bergmann, K. C. and Reutgen, H. (1978). "Allergy and lectins: action between IgE-mediated histamine release and glycoproteins from *Viscum album* L. (mistletoe)." *Acta Biol Med Ger* 37: 1623.
- Luther, P., Theise, H., Chatterjee, B., Karduck, D. and Uhlenbruck, G. (1980). "The Lectin from *Viscum album* L.- isolation, characterization, properties and structure." *Int J Biochem* 11: 429.
- Mackay, C. R., Hein, W. R., Brown, M. H. and Matzinger, P. (1988). "Unusual expression of CD2 in sheep: implications for T cell interactions." *Eur J Immunol* 18: 1681.
- Marshall, V. M., Cole, W. M. and Bramley, A. J. (1986). "Influence of the lactoperoxidase system on susceptibility of the udder to *Streptococcus uberis* infection." *J Dairy Res* 53: 507.
- Matsunaga, T., Kamata, S., Kakiichi, N. and Uchida, K. (1993). "Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis." *J Vet Med Sci* 55: 297.

- Matthews, K. R. and Oliver, S. P. (1993). "Encapsulation of streptococci isolated from bovine milk." *Zentralbl Veterinarmed [B]* 40: 597.
- Matthiessen, P. F. and Tröger, W. (1995). "Die Misteltherapie des Krebses." In: „Kombinierte Tumorthherapie“, Hrsg: Wrba, Heinrich, 2. Auflage, Hippokrates Verlag, Stuttgart.
- McDonald, J. S. (1984). "Streptococcal and staphylococcal mastitis." *Vet Clin North Am Large Anim Pract* 6: 269.
- McDonald, J. S. and Anderson, A. J. (1981). "Experimental intramammary infection of the dairy cow with *Escherichia coli* during the nonlactating period." *Am J Vet Res* 42:229-31
- Metzner, G., Franz, H., Kindt, A., Fahlbusch, B. and Suss, J. (1985). "The in vitro activity of lectin I from mistletoe (ML I) and its isolated A and B chains on functions of macrophages and polymorphonuclear cells." *Immunobiology* 169: 461.
- Miller, R. H., Guidry, A. J., Paape, M. J., Dulin, A. M. and Fulton, L. A. (1988). "Relationship between immunoglobulin concentrations in milk and phagocytosis by bovine neutrophils." *Am J Vet Res* 49: 42.
- Miltenburg, J. D., de Lange, D., Crauwels, A. P., Bongers, J. H., Tielen, M. J., Schukken, Y. H. and Elbers, A. R. (1996). "Incidence of clinical mastitis in a random sample of dairy herds in the southern Netherlands." *Vet Rec* 31: 204.
- Möckel, B., Schwarz, T., Zinke, H., Eck, J. and Langer, M. (1997). "Effects of mistletoe lectin I on human blood cell lines and peripheral blood cells. Cytotoxicity, apoptosis and induction of cytokines." *Arzneimittelforschung* 47:1145-51
- Myllys, V., Honkanen-Buzalski, T., Huovinen, P., Sandholm, M. and Nurmi, E. (1994). "Association of changes in the bacterial ecology of bovine mastitis with changes in the use of milking machines and antibacterial drugs." *Acta Vet Scand* 35: 363.
- Nickerson, S. C. (1985). "Immune mechanisms of the bovine udder: An overview." *J Am Vet Med Assoc* 187: 41.
- Nickerson, S. C. (1988). "Immunity and the bovine mammary gland, part 2: specific Defenses and cellular immune mechanisms." *Agri-Practice* 9: 32.
- Nickerson, S. C. (1993a). "Eliminating chronic *Staphylococcus aureus* mastitis." *Vet Med* 375.

- Nickerson, S. C. (1993b). "Controlling *Staphylococcus aureus* mastitis through prevention and therapy." *Vet Med* 366.
- Nickerson, S. C. and Owens, W. E. (1993). "Staphylococcus aureus Mastitis: Reasons for treatment failures and therapeutic approaches for control." *Agri-Practice* 14: 18.
- Nickerson, S. C., Owens, W. E. and Boddie, R. L. (1995). "Mastitis in dairy heifers: initial studies on prevalence and control." *J Dairy Sci* 78: 1607.
- Nickerson, S. C., Owens, W. E. and Watts, J. L. (1989). "Effects of recombinant granulocyte colony-stimulating factor on *Staphylococcus aureus* mastitis in lactating dairy cows." *J Dairy Sci* 72: 3286.
- Nickerson, S. C., Watts, J. L., Boddie, R. L. and Ray, C. H. (1990). "Effect of postmilking teat antisepsis on teat canal infections in lactating dairy cows." *J Dairy Sci* 73: 373.
- Nonnecke, B. J. and Smith, K. L. (1984). "Inhibition of mastitic bacteria by bovine milk apo-lactoferrin evaluated by in vitro microassay of bacterial growth." *J Vet Sci* 67: 606.
- Norcross, N. L. (1977). "Immune response of the mammary gland and role of immunization in mastitis control." *J Am Vet Med Assoc* 170: 1228.
- Norden, C. W. and Keleti, E. (1981). "Antibiotic tolerance in strains of *Staphylococcus aureus*." *J antimicrob Chemother* 7: 599.
- Nordhaug, M. L., Nesse, L. L., Norcross, N. L. and Gudding, R. (1994a). "A field trial with an experimental vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis in cattle. 1. Clinical parameters." *J Dairy Sci* 77: 1267.
- Nordhaug, M. L., Nesse, L. L., Norcross, N. L. and Gudding, R. (1994b). "A field trial with an experimental vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis in cattle. 2. Antibody response." *J Dairy Sci* 77: 1276.
- Novick, R. P. (1981). "Plasmide." *Spektrum Wiss* 6: 34.
- Oliver, S. P., Lewis, M. J., Gillespie, B. E. and Dowlen, H. H. (1997). "Antibiotic residues and prevalence of mastitis pathogen isolation in heifers during early lactation following prepartum antibiotic therapy." *Zentralbl Veterinarmed [B]* 44: 213.
- Oliver, S. P., Lewis, M. J., Ingle, T. L., Gillespie, B. E. and Matthews, K. R. (1993). "Prevention of bovine mastitis by a premilking teat disinfectant containing chlorous acid and chlorine dioxide." *J Dairy Sci* 76: 287.

- Overstolz, A. (2000). "Iscador Mistelpräparate aus der anthroposophisch erweiterten Krebsbehandlung." Verlag für Ganzheitsmedizin, Basel.
- Olsnes, S., Stirpe, F., Sandvig, K. and Pihl, A. (1982). "Isolation and characterization of viscumin, a toxic lectin from *Viscum album* L. (mistletoe)." *J Biol Chem* 257: 13263.
- Outteridge, P. M. and Lee, C. S. (1988). "The defence mechanisms of the mammary gland of domestic ruminants." *Prog Vet Microbiol Immunol* 4: 165.
- Owens, W. E. (1987). "Isolation of *Staphylococcus aureus* L forms from experimentally induced bovine mastitis." *J Clin Microbiol* 25: 1956.
- Owens, W. E. and Nickerson, S. C. (1989). "Antibiotic levels in milk and mammary tissue during various treatment regimens for bovine mastitis." *Agri-Practice* 10: 10.
- Owens, W. E., Watts, J. L., Boddie, R. L. and Nickerson, S. C. (1988). "Antibiotic treatment of mastitis: comparison of intramammary and intramammary plus intramuscular therapies." *J Dairy Sci* 71: 3143.
- Owens, W. and Nickerson S. C. (1990). "Treatment of *Staphylococcus aureus* mastitis with penicillin and novobiocin: antibiotic concentrations and bacteriologic status in milk and mammary tissue." *J Dairy Sci* 73: 115.
- Owens, W., Nickerson, S. C. Washburn, P. J. and Ray, C. H. (1991). "Efficacy of a cephapirin dry cow product for treatment of experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis in heifers." *J Dairy Sci* 74: 3376.
- Paape, M. J., Wergin, W. P. and Guidry, A. J. (1981). "Phagocytic defense of the ruminant mammary gland." *Adv Exp Med Biol* 137: 555.
- Paape, M. J., Wergin, W. P., Guidry, A. J. and Pearson, R. E. (1979). "Leukocytes second line of defense against invading mastitis pathogens." *J Dairy Sci* 62: 135.
- Pankey, J. W., Boddie, N. T., Watts, J. L. and Nickerson, S. C. (1985). "Evaluation of protein A and a commercial bacteria as vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis by experimental challenge." *J Dairy Sci* 68: 726.
- Pankey, J. W., Wildman, E. E., Drechsler, P. A. and Hogan, J. S. (1987). "Field trial evaluation of premilking teat disinfection." *J Dairy Sci* 70: 867.

- Park, Y. H., Fox, L. K., Hamilton, M. J. and Davis, W. C. (1992). "Bovine mononuclear leucocyte subpopulations in peripheral blood and mammary gland secretions during lactation." *J Dairy Sci* 75: 998.
- Philpot, W. N. (1979). "Control of mastitis by hygiene and therapy." *J Dairy Sci* 62: 168.
- Politis, I., Zhao, X., McBride, B. W. and Burton, J. H. (1991). "Examination of chemotactic properties of bovine mammary macrophages." *Can J Vet Res* 55: 321.
- Pora, A., Pop, E., Rosca, D. and Rachu, A. (1957). "Der Einfluss der Wirtspflanze auf den Gehalt an hypotensiven und herzwirksamen Prinzipien der Mistel (*Viscum album* L.)." *Pharmazie* 12: 528.
- Pyörälä, S. and Mattila, T. (1987). "Inflammatory changes during experimental bovine mastitis induced by *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis*." *Zentralbl Veterinarmed A* 34:574-81
- Rainard, P., Ducelliez, M. and Poutrel, B. (1990). "The contribution of mammary infections by coagulase-negative staphylococci to the herd bulk milk somatic cell count." *Vet Res Commun* 14: 193.
- Rainard, P. and Poutrel, B. (1982). "Dynamics of nonclinical bovine intramammary infections with major and minor pathogens." *Am J Vet Res* 43: 2143.
- Raven, P. H. (1988). "Biologie der Pflanzen." 2. verb. Auflage, Verlag de Gruyter, Berlin.
- Reddy, P. G., McVey, D. S., Chengappa, M. M., Blecha, F., Minocha, H. C. and Baker, P. E. (1990). "Bovine recombinant granulocyte-colony stimulating factor enhancement of bovine neutrophil functions in vitro." *Am J Vet Res* 51: 1395.
- Reed, L. J. and Münch, H. (1938). "A simple method of estimating fifty per cent end points." *Am J Hyg* 27: 493.
- Reichmuth, J. (1975). "Somatic cell counting-interpretation of results." *IDF Doc* 85: 93.
- Reiter, B. (1978). "Review of nonspecific antimicrobial factors in colostrum." *Ann Rech Vet* 9: 205.
- Rentea, R., Lyon, E. and Hunter, R. (1981). "Biologic properties of iscador: a *Viscum album* preparation I. Hyperplasia of the thymic cortex and accelerated regeneration of hematopoietic cells following X-irradiation." *Lab Invest* 44: 43.

- Ribéreau-Gayon, G., Dumont, S., Muller, C., Jung, M. L., Poindron, P. and Anton, R. (1996). "Mistletoe lectins I, II and III induce the production of cytokines by cultured human monocytes." *Cancer Lett* 109: 33.
- Ribéreau Gayon, G., Jung, M. L., Baudino, S., Salle, G. and Beck, J. P. (1986). "Effects of mistletoe (*Viscum album* L.) extracts on cultured tumor cells." *Experientia* 42: 594.
- Rolle, M. (1993). "Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre für Tierärzte, Biologen, Agrarwissenschaftler und Interessierte aus benachbarten Fachgebieten." Anton Mayr, Stuttgart.
- Rosenberger, G. (1990). "Die klinische Untersuchung des Rindes." Gerrit Dirksen et al., Berlin.
- Rossetti, C. A. (1993). "Prevalence of subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus* in the Buenos Aires dairy area and its susceptibility to antibiotics." *Vet Argentina* 10: 323.
- Ruffo, V. and Zecconi, A. (1994). "Update on mastitis aetiology and epidemiology." XVIII World Buiatr. Cong., Bologna, Italy, World Buiatr. Assoc. Bologna, Italy.
- Rüsch, P. (2000). "Bestandesbetreuung in der Umsetzung: Probleme und Lösungen." Bestandesbetreuung beim Rind, Fortsetzungsseminar, Vulpera.
- Salzer, G. (1986). "Pleura carcinosis. Cytomorphological findings with the mistletoe preparation iscador and other pharmaceuticals." *Oncology* 43 Suppl 1: 66.
- Sanchez, M. S., Ford, C. W. and Yancey, R. J. (1988). "Evaluation of antibiotic effectiveness against *Staphylococcus aureus* surviving within the bovine mammary gland macrophage." *J Antimicrob Chemother* 21: 773.
- Sandholm, M., Kaartinen, L. and Pyörälä, S. (1990). "Bovine mastitis-why does antibiotic therapy not always work? An overview." *J Vet Pharmacol Ther* 13: 248.
- Schällibaum, M. (1999). "Mastitis control in member countries." *Switzerland Mastitis News* 23: 14.
- Schalm, O. W. (1977). "Pathologic changes in the milk and udder of cows with mastitis." *J Am Vet Med Assoc* 170: 1137.
- Schink, M. (1990). "Vergleichende Untersuchungen über das Proteinmuster der europäischen Mistel (*Viscum album* L.) mit Hilfe der zweidimensionalen

Polyacrylamid Gelelektrophorese." Dissertation, Universität Hohenheim, Hohenheim

- Sears, P. M., Smith, B. S., English, P. B., Herer, P. S. and Gonzalez, R. N. (1990). "Shedding pattern of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infections." *J Dairy Sci* 73: 2785.
- Selsted, M. E., Tang, Y. Q., Morris, W. L., McGuire, P. A., Nonotny, M. J., Smith, W., Henschen, A. H. and Cullor, H. S. (1993). "Purification, primary structures, and antibacterial activities of the beta-defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils." *J Biol Chem* 268: 6641.
- Silberstein, D. S., Owen, W. F., Gasson, J. C., Di Persio, J. F., Golde, D. W., Bina, J. C., Soberman, R., Austen, K. F. and David, J. R. (1986). "Enhancement of human eosinophil cytotoxicity and leukotriene synthesis by biosynthetic (recombinant) granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." *J Immunol* 15: 3290.
- Sischo, W. M., Heider, L. E., Miller, G. Y. and Moore, D. A. (1993). "Prevalence of contagious pathogens of bovine mastitis and use of mastitis control practices." *J Am Vet Med Assoc* 15: 595.
- Soback, S., Ziv, G., Winkler, M. and Saran, A. (1990). "Systemic dry cow therapy-a preliminary report." *J Dairy Sci* 73: 661.
- Sordillo, L. M. and Nickerson, S. C. (1988). "Morphometric changes in the bovine mammary gland during involution and lactogenesis." *Am J Vet Res* 49: 1112.
- Sordillo, L. M., Nickerson, S. C. and Akers, R. M. (1989). "Pathology of *Staphylococcus aureus* mastitis during lactogenesis: relationships with bovine mammary structure and function." *J Dairy Sci* 72: 228.
- Sordillo, L. M. and Peel, J. E. (1992). "Effect of interferon-gamma on the production of tumor necrosis factor during acute *Escherichia coli* mastitis." *J Dairy Sci* 75: 2119.
- Sordillo, L. M., Redmond, M. J., Campos, M., Warren, L. and Babiuk, L. A. (1991a). "Cytokine activity in bovine mammary gland secretions during the periparturient period." *Can J Vet Res* 55: 298.
- Sordillo, L. M., Shafer-Weaver, K. and De Rosa, D. (1997). "Immunobiology of the mammary gland." *J Dairy Sci* 80: 1851.

- Sordillo, L. M., Snider, M., Hughes, H., Afseth, G., Campos, M. and Babiuk, L. A. (1991b). "Pathological changes in bovine mammary glands following intramammary infusion of recombinant interleukin-2." J Dairy Sci 74: 4164.
- Stein, G. (1995). "Untersuchungen zur Interaktion von Mistelantigenen mit dem Immunsystem." Dissertation, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
- Stein, G. M. and Berg, P. A. (1996). "Evaluation of the stimulatory activity of a fermented mistletoe lectin-1 free mistletoe extract on T-helper cells and monocytes in healthy individuals in vitro." Arzneimittelforschung 46: 635.
- Stein, G. M., Schaller, G., Pfuller, U., Schietzel, M. and Bussing, A. (1999). "Thionins from *Viscum album* L: influence of the viscotoxins on the activation of granulocytes." Anticancer Res 19: 1037.
- Stettin, A. (1992). "Induktion spezifischer Immunreaktionen während der Behandlung mit wässrigem Mestelextrakt." Dissertation, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
- Stettin, A., Schultze, J. L., Stechemesser, E. and Berg, P. A. (1990). "Anti-mistletoe lectin antibodies are produced in patients during therapy with an aqueous mistletoe extract derived from *Viscum album* L. and neutralize lectin-induced cytotoxicity in vitro." Klin Wochenschr 68: 896.
- Stirpe, F., Legg, R. F., Onyon, L. J., Ziska, P. and Franz, H. (1980). "Inhibition of protein synthesis by a toxic lectin from *Viscum album* L. (mistletoe)." Biochem J 190: 843.
- Stirpe, F., Sandvig, K., Olsnes, S. and Pihl, A. (1982). "Action of viscumin, a toxic lectin from mistletoe, on cells in culture." J Biol Chem 257: 13271.
- Stoss, M., van Wely, M., Musielsky, H. and Gorter, R. W. (1999). "Study on local inflammatory reactions and other parameters during subcutaneous mistletoe application in HIV-positive patients and HIV-negative subjects over a period of 18 weeks." Arzneimittelforschung 49: 366.
- Tao, W., Dougherty, R., Johnston, P. and Pickett, W. (1993). "Recombinant bovine GM-CSF primes superoxide production, but not degranulation induced by recombinant bovine interleukin-1 in bovine neutrophils." J Leuk Biol 53: 679.
- Targowski, S.P. and Berman, D. T. (1975). "Leukocytic response of bovine mammary gland to injection of killed cells and cell walls of *Staphylococcus aureus*." Am J Vet Res 36: 1561.

- Taylor, B. C., Dellinger, J. D., Cullor, J. S. and Scott, J. L. (1994). "Bovine milk lymphocytes display the phenotype of memory T cells and are predominantly CD8+." *Cell Immunol* 156: 245.
- Thomas, L. H., Haider, W., Hill, A. W. and Cook, R. S. (1994). "Pathologic findings of experimentally induced *Streptococcus uberis* infection in the mammary gland of cows." *Am J Vet Res* 55: 1723.
- Todhunter, D. A., Smith, K. L. and Hogan, J. S. (1995). "Environmental streptococcal intramammary infections of the bovine mammary gland." *J Dairy Sci* 78: 2366.
- Todhunter, D. A., Smith, K. L. and Schoenberger, P. S. (1985). "In vitro growth of mastitis-associated streptococci in bovine mammary secretions." *J Dairy Sci* 68: 2337.
- Tolle, A. (1983). "Hygiene der Milch." Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Torre, P. M., Konur, P. K. and Oliver, S. P. (1992). "Proliferative response of mammary gland mononuclear cells to recombinant bovine interleukin-2." *Vet Immunol Immunopathol* 32: 351.
- Trinidad, P., Nickerson, S. C. and Alley, T. K. (1990). "Prevalence of intramammary infection and teat canal colonization in unbred and primigravid dairy heifers." *J Dairy Sci* 73: 107.
- Urech, E., Puhan, Z. and Schällibaum, M. (1998). "Changes in milk protein fraction as affected by subclinical mastitis." *J Vet Med A* 45: 45
- Verein für Krebsforschung (1996). "Iscador – Informationen. Von der Mistel zum Iscador." Verein für Krebsforschung, Arlesheim, Ostfildern.
- Vestweber, J. G. (1994). "Staphylococcus aureus Mastitis. Part II. Diagnostic aids, Therapy, and control." *Comp Cont Educat Pract Vet* 16: 217.
- Vestweber, J. G. and Leipold, H. W. (1993). "Mastitis. Part I. Virulence, defense mechanisms, and establishment of infection." *Comp Cont Educat Pract Vet* 15: 1561.
- Wagner, H., Feil, B. and Bladt, S. (1984). "Viscum album - die Mistel. Analyse und Standardisierung von Arzneidrogen und Phytopräparaten durch Hochleistungsflüssigkeiteschromatographie (HPLC) und andere chromatographische Verfahren (III)." *Dt Apoth Ztg* 124: 1429.

- Wagner, R. F. (1996). "Iscador - Informationen Iscador M 5 mg spezial, Iscador Qu 5 mg spezial." Verein für Krebsforschung, Arlesheim, Ostfildern.
- Watts, J. L. (1988). "Etiological agents of bovine mastitis." *Vet Microbiol* 16: 41.
- Weaver, L. D., Galland, J., Martin, P. A. and Versteeg, J. (1986). "Treatment of *Streptococcus agalactiae* mastitis in dairy cows: comparative efficacies of two antibiotic preparations and factors associated with successful treatment." *J Am Vet Med Assoc* 189:666.
- Weber, K., Mengs, U., Schwarz, T., Hajto, T., Hostanska, K., Allen, T. R., Weyhenmeyer, R. and Lentzen, H. (1998). "Effects of a standardized mistletoe preparation on metastatic B16 melanoma colonization in murine lungs." *Arzneimittelforschung* 48: 497.
- Weinberg, E. D. (1978). "Iron and infection." *Microbiol Rev* 42: 45.
- Weir, M. D. and Stewart, J. (1997). "Immunology." Churchill Livingstone, New York, Edinburgh, London, Madrid, Melbourne, San Francisco and Tokyo.
- Weleda AG (1999). "Richtlinien für die Iscador®-Behandlung in der Malignomtherapie." Arlesheim.
- Wendt, K., Mielke, H. and Bostedt, H.: (1994). "Euter- und Gesäugekrankheiten." 2. Aufl. Enke., Stuttgart.
- Wichtl, M. (1984). "Mistelkraut, Visci Herba, Herba Visci. Teedrogen." GmbH Stuttgart, Stuttgart
- Wilson, D. J., Gonzalez, R. N. and Das, H. H. (1997). "Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: prevalence and effects on somatic cell count and milk production." *J Dairy Sci* 80: 2592.
- Wirt, D. P., Adkins, L. T., Palkowetz, K. H., Schmalstieg, F. C. and Goldman, A. S. (1992). "Activated and memory T lymphocytes in human milk." *Cytometry* 13: 282.
- Witte, W., Green, L., Misra, T. and Silver, S. (1986). "Resistance to mercury and to cadmium in chromosomally resistant *Staphylococcus aureus*." *Antimicrob Agents and Chemother* 28: 663.
- Wolff, O. (1970). "Die Mistel in der Krebsbehandlung." Verlag Freies Geistesleben, Stuttgart.

Yamagata, M., Goodger, W. J., Weaver, L. and Franti, C. (1987). "The economic benefit of treating subclinical *Streptococcus agalactiae* mastitis in lactating cows." J Am Vet Med Assoc 15: 1556.

12 Dank

Mein herzlicher Dank gilt besonders:

Herrn Prof. Dr. Peter Rüsch und anschliessend Prof. Dr. Wolfgang Kähn für die Übernahme des Referates.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Langhans für die Übernahme des Korreferats sowie für zahlreiche wertvolle Anregungen, fachliche und kritische Diskussionen und Ratschläge sowie die kritische Durchsicht der vorliegenden Arbeit.

Herrn Dr. Jörg Spranger für die Überlassung des Themas sowie die Betreuung der Arbeit.

Dem Forschungsinstitut Hiscia für die Bereitstellung der Mistelpräparate, durchgeführten Analysen und finanzielle Unterstützung meiner Arbeit. Insbesondere Herrn Dr. Michael Werner für die vielen kritischen Einwände, konstruktiven Lösungsvorschläge und seine Gesprächsbereitschaft.

Herrn Peter Klocke für die hilfreichen Gespräche, konstruktive Kritik, sowie das Korrekturlesen und kritische Durchsicht der vorliegenden Arbeit. Durch seine hilfreichen Anregungen und stete Diskussionsbereitschaft trug er entscheidend zum Gelingen der vorliegenden Arbeit bei.

Dr. Dirk Werling für die durchgeführten FACS-Analysen, die gründliche Durchsicht der Arbeit, sowie fachliche und kritische Diskussionen, kritische Einwände und Ratschläge.

Myrtha Arnold für ihre freundliche Hilfsbereitschaft in jeder Zeit, sowie Gesprächsbereitschaft und wertvollen zahlreichen Ratschläge bei Laborarbeiten.

Dr. H. Leuenberger und dem Stallpersonal des ETH- Betriebs in Chamau für die Tiere und für ihre Mithilfe.

Peter und Ruth Ritter für ihre Mithilfe und erweisende Freundschaft sowie für die schöne Zusammenarbeit.

Meinem Freund Roy Richner für die ersten Korrekturen der vorliegenden Arbeit, für seine wertvollen zahlreichen Gespräche und Ratschläge sowie seine Hilfsbereitschaft in jeder Zeit, Geduld und freundliche Unterstützung.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Irena Marc
Geburtsdatum	8.12.1966
Staatsangehörigkeit	Slowenien

Ausbildung

1973 - 1981	Primarschule, Ajdovščina
1981 - 1985	Mittlere Schule für den Agrar- und Lebensmittelbereich, Maribor
1985 - 1992	Studium in Veterinärmedizin an der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Ljubljana
1992	Abschluss des Studiums
1992 - 1993	Praktisches Jahr in der Tierpraxis der Landwirtschaftlichen Veterinäranstalt Nova Gorica
1993	Approbation als Tierärztin
1993 - 1995	Tätigkeit als Tierärztin in der Tierpraxis der Landwirtschaftlichen Veterinäranstalt Nova Gorica
1995 - 1997	Tätigkeit als Veterinärinspektorin in der Veterinäranstalt Sloweniens, Organisationseinheit Nova Gorica
1997 - 2001	Doktorandin an der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich und am Forschungsinstitut für biologischen Landbau (FiBL), Frick/AG
Seit 2001	Fachleiterin des Zentrums für Naturrekultivierung Vremščica, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Ljubljana